



Rôle des facteurs écologiques dans le processus de spéciation en milieu insulaire. Effet de l'habitat et des pollinisateurs sur la diversification du faham (*Jumellea* spp., Orchidaceae) aux Mascareignes

Bertrand Mallet

► To cite this version:

Bertrand Mallet. Rôle des facteurs écologiques dans le processus de spéciation en milieu insulaire. Effet de l'habitat et des pollinisateurs sur la diversification du faham (*Jumellea* spp., Orchidaceae) aux Mascareignes. Ecologie, Environnement. Université de la Réunion, 2014. Français. NNT : 2014LARE0020 . tel-01208146

HAL Id: tel-01208146

<https://theses.hal.science/tel-01208146>

Submitted on 2 Oct 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE

Présentée à l'Université de la Réunion
pour obtenir le diplôme de **DOCTORAT**

SPÉCIALITÉ : Biologie des Populations et Écologie
ÉCOLE DOCTORALE : Sciences Technologies Santé

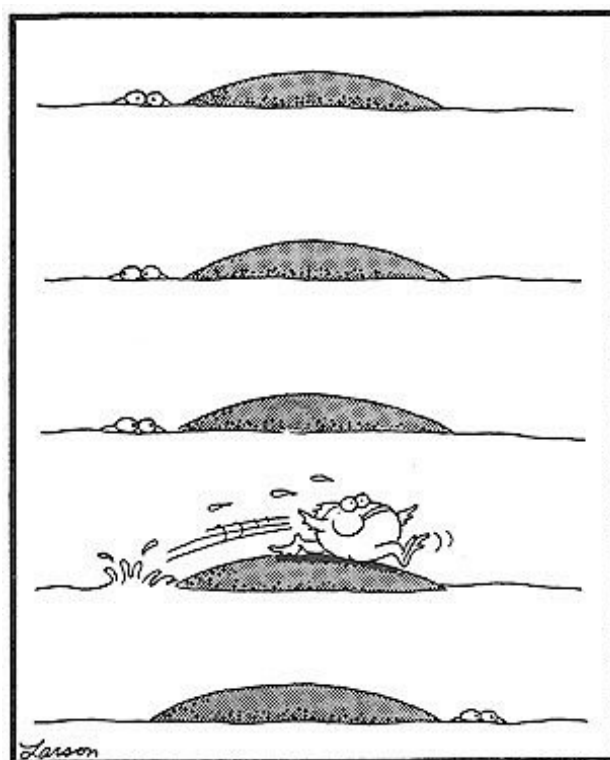
RÔLE DES FACTEURS ÉCOLOGIQUES DANS LE PROCESSUS DE SPÉCIATION EN MILIEU INSULAIRE

Effet de l'habitat et des pollinisateurs sur la diversification du faham
(*Jumellea spp.*, Orchidaceae) aux Mascareignes

Bertrand MALLET

Soutenue publiquement le 7 novembre 2014 devant le jury composé de :

Guillaume BESNARD chargé de recherche première classe, CNRS, Toulouse	Rapporteur
Bertrand SCHATZ, directeur de recherche, CNRS, Montpellier	Rapporteur
Pascale BESSE, professeure, Université de La Réunion	Examinatrice
Luc GIGORD, directeur du Conservatoire Botanique National de Mascarin	Examineur
Laurence HUMEAU, maître de conférence, Université de La Réunion	Examinatrice
Thierry PAILLER, professeur, Université de La Réunion	Directeur



Another great moment in evolution

Résumé

Les mécanismes à l'origine de la mise en place de l'isolement reproducteur sont relativement peu étudiés dans les radiations adaptatives insulaires. Selon la théorie de la spéciation écologique, l'isolement reproducteur résulte de la sélection divergente agissant sur des populations écologiquement différentes. Par leurs caractéristiques uniques, les îles océaniques constituent des systèmes idéals pour étudier le rôle des facteurs écologiques dans la diversification des lignées endémiques. Le rôle de l'habitat et des pollinisateurs dans la restriction des flux géniques inter et intraspécifique est examiné chez le faham (*Jumellea rossii* et *J. fragrans*), une orchidée endémique des Mascareignes. Pour ce faire, les patrons de différenciation phénotypique (traits floraux morphologiques et chimiques), environnementale (habitat, altitude, climat) et génétique (microsatellites nucléaires) ont été confrontés. A l'échelle intraspécifique, les résultats montrent que les flux de gènes sont principalement limités par les différences environnementales entre habitats sans rôle évident des pollinisateurs. A l'échelle interspécifique, outre les variations d'habitat, le changement de pollinisateur semble expliquer l'absence de flux de gènes. Dans le cadre du continuum de spéciation chez le faham, l'isolement reproducteur évoluerait en premier lieu en réponse à l'adaptation aux différents habitats, puis serait renforcé par l'adaptation à différents pollinisateurs. La révision de la taxinomie du clade et les priorités en terme de conservation sont également discutées.

Abstract

THE ROLE OF ECOLOGY IN ISLAND SPECIATION

Effect of habitat and pollinator shifts on the diversification of faham
(*Jumellea spp.*, Orchidaceae) in the Mascarene Islands

Mechanisms responsible for the establishment of reproductive isolation are little studied in island adaptive radiations. According to the theory of ecological speciation, reproductive isolation results from the ecologically-based divergent selection. By their unique characteristics, oceanic islands are ideal systems to study the role of ecological factors in the diversification of endemic lineages. This study focuses on the role of habitat and pollinators in restricting inter and intraspecific gene flow between populations of faham (*Jumellea spp.*), an orchid endemic to Mascarene Islands. To do this, patterns of phenotypic differentiation (floral traits), environmental differentiation (habitat, altitude, climate) and genetic differentiation (nuclear microsatellites) were compared. At the intraspecific level, the results show that gene flow restriction is mainly due to the colonization of different habitat types with no obvious role of pollinators. At the interspecific level, in addition to the role of habitat, pollinator shift seems to explain effective complete reproductive isolation. By placing these results into the continuum of speciation, it appears that reproductive isolation evolve initially in response to adaptation to different habitats and, in a second phase, would be enhanced by pollinator-driven divergent selection. Operationally, this study reviews the taxonomy of faham and proposes to define management units and priorities in terms of conservation.

Remerciements

‘Autrui, pièce maîtresse de mon univers.’

Michel Tournier, Vendredi ou les limbes du Pacifique.

En premier lieu, je tiens à remercier très sincèrement mon directeur de thèse Thierry Pailler et mon encadrante Laurence Humeau de m’avoir permis de découvrir la recherche scientifique en écologie évolutive il y a déjà six ans et d’avoir ensuite accepté de m’encadrer sur une thèse de doctorat. Je remercie Thierry en particulier pour avoir partagé ses nombreuses connaissances sur les milieux naturels de la Réunion et pour avoir su m’emporter dans ses réflexions aussi passionnantes que déstabilisantes. J’ai vraiment apprécié les sorties en forêt que l’on a pu faire ensemble et les discussions scientifiques que l’on a pu avoir. Je remercie Laurence pour son soutien sans faille, pour sa disponibilité inconditionnelle, pour sa rigueur, pour sa gentillesse, pour les nombreuses discussions de travail où elle a toujours accepté mes *‘Non, mais ...’*, pour m’avoir initié à la biologie moléculaire, à la rédaction d’article scientifique. Bref, pour avoir fait en sorte que je puisse réaliser ce travail de thèse dans les meilleures conditions possibles.

Je remercie Florent Martos pour sa précieuse contribution à ce travail de thèse, pour son enthousiasme communicatif et pour avoir permis la collaboration avec l’Afrique du sud.

Merci au Conseil Général de la Réunion, à l’Université de la Réunion, au Ministère des Outre-mer, à la Région Réunion et à la Société Botanique de France d’avoir participé au financement de ce projet.

Merci au Parc national de la Réunion, à l’Office National des Forêts de la Réunion et au National Parks & Conservation Services qui ont permis la réalisation de ce travail en fournissant les autorisations administratives et les appuis logistiques des campagnes de terrain. Merci à Claudia Baider du Mauritius Herbarium et Steve Johnson de l’Université du Kwazulu-Natal d’avoir accepté de collaborer à ce travail.

Merci aux membres du jury — Guillaume Besnard, Bertrand Schatz, Pascale Besse et Luc Gigord — d’avoir accepté d’évaluer ce travail.

Je tiens aussi à remercier toute l'équipe de l'UMR PVBMT de m'avoir accueilli dans leur laboratoire. Merci en particulier à Dominique, Johanna, Pascale, Fabien, Lionel, Karine, Denis et Marie-Hélène pour leur aide et leurs encouragements.

Je remercie chaleureusement Jacques Fournel, Sébastien Albert, Vincent Florens, Alain Jubault et Patrice Bernet pour la collecte d'échantillons. Merci à Christian Guillermet de m'avoir accompagné lors d'une 'chasse' aux pollinisateurs et d'avoir identifié les pollinisateurs à partir des vidéos.

Merci aux stagiaires — Sylvain Guichard, Ali M'Dere, Anne-Sarah Padre et Ludivine Sam-Long — pour leur contribution à ce travail.

Merci à Alex, Amandine, Audrey, Benoît, Elise, Fred, Gaël, Guillaume, Laurence, Laury, Morgane et Michel pour votre aide sur le terrain.

Un grand merci à ceux qui m'ont permis de négocier la dernière ligne droite plus ou moins sereinement en acceptant de réaliser certaines tâches ingrates. Je pense à Stéphanie et Laury pour la relecture du mémoire ainsi qu'à Anne, David et Corto pour la mise en page du document.

Un immense merci à mes acolytes réunionnais, normands et épônois pour leur soutien infaillible, leur encouragement et pour tous ces moments qui rendent la vie plus douce.

Un énorme merci à ma famille qui m'a toujours soutenu, aidé et encouragé, même lorsque j'ai décidé d'aller m'installer à l'autre bout du monde. J'ai une pensée particulière pour Léonie que je hâte de rencontrer.

Merci enfin à ma bretonne préférée de non seulement supporter un normand dans son foyer mais en plus de prendre soin de lui, cette thèse est aussi la tienne.

Table des Matières

1	Introduction générale	1
1.1.	<i>Cadre théorique: la spéciation écologique</i>	3
1.1.1.	De Darwin à la définition actuelle de la spéciation écologique	3
1.1.2.	Le continuum de spéciation	7
1.1.3.	Les mécanismes de la spéciation écologique	9
1.1.4.	Les facteurs affectant la progression de la spéciation écologique	11
1.1.5.	L'étude de la spéciation écologique	12
1.1.6.	L'importance de la spéciation écologique dans la nature	15
1.1.7.	Les mécanismes alternatifs	16
1.2.	<i>La spéciation écologique dans les systèmes insulaires</i>	19
1.2.1.	Intérêt dans l'étude de la spéciation en milieu insulaire	19
1.2.2.	Les exemples connus de spéciation écologique en milieu insulaire	22
1.2.3.	Le cas des Mascareignes	23
1.3.	<i>Contexte de l'étude : les orchidées Angraecinae des Mascareignes</i>	28
1.3.1.	Biogéographie des Angraecinae aux Mascareignes	30
1.3.2.	Rôle de l'interaction plante-pollinisateur dans la radiation de la section Hadrangis	31
1.3.3.	Le genre <i>Jumellea</i>	32
1.4.	<i>Problématique, objectifs et structure de la thèse</i>	34
2	Différences morphologiques et identification de <i>Jumellea rossii</i> et <i>Jumellea fragrans</i> (Orchidaceae) à l'île de la Réunion : implications pour la conservation	37
2.1.	<i>Présentation de l'article</i>	39
2.1.1.	Résumé	39
2.1.2.	Abstract	40
2.2.	<i>Introduction</i>	41
2.3.	<i>Matériels et méthodes</i>	43
2.3.1.	Sites d'étude	43
2.3.2.	Matériel biologique	44
2.3.3.	Mesures végétatives et florales	46
2.4.	<i>Résultats</i>	48
2.4.1.	Phénologie florale	48
2.4.2.	Mesures des caractères végétatifs et reproducteurs	48
2.5.	<i>Discussion</i>	50
2.5.1.	Différences taxonomiques au sein du complexe du faham	50
2.5.2.	Origine de la confusion taxonomique et identification des taxons	52
2.5.3.	Caractères morphologiques discriminants les deux espèces	54
2.5.4.	Implications pour la conservation du faham	55
2.6.	<i>Remerciements</i>	56

3	Delineation of evolutionary significant units in the Mascarene endemic Faham complex (<i>Jumellea</i> spp.) from genetic and ecological distinctiveness.	57
	<i>3.1. Présentation de l'article</i>	59
	3.1.1. Résumé	59
	3.1.2. Abstract	60
	<i>3.2. Introduction</i>	61
	<i>3.3. Materials and methods</i>	63
	3.3.1. Study area and species	63
	3.3.2. Genotyping	64
	3.3.3. Genetic diversity	65
	3.3.4. Neutral genetic structure	65
	3.3.5. Adaptive phenotypic structure	67
	3.3.6. Definition of conservation units and assessment of their extinction risk	67
	<i>3.4. Results</i>	68
	3.4.1. Genetic diversity	68
	3.4.2. Genetic and phenotypic clustering	71
	3.4.3. Genetic and phenotypic structure by habitat	73
	3.4.4. Conservation units and extinction risk	74
	<i>3.5. Discussion</i>	75
	3.5.1. Taxonomic delimitations	75
	3.5.2. Ecological-driven divergence	77
	3.5.3. Conservation implications	77
	<i>3.6. Acknowledgements</i>	78
4	Pollinator and habitat shifts promote ecological speciation between two orchid sister species in Réunion	79
	<i>4.1. Présentation de l'article</i>	81
	4.1.1. Résumé	81
	4.1.2. Abstract	82
	<i>4.2. Introduction</i>	83
	<i>4.3. Materials and methods</i>	86
	4.3.1. Study area and species	86
	4.3.2. Genetic differentiation	88
	4.3.3. Postmating isolation	89
	4.3.4. Geographic and temporal isolation	90
	4.3.5. Floral morphology and nectar properties	90
	4.3.6. Floral scent	91
	4.3.7. Pollinator observations	92
	<i>4.4. Results</i>	93
	4.4.1. Genetic differentiation	93
	4.4.2. Postmating isolation	94
	4.4.3. Geographic and temporal isolation	95
	4.4.4. Floral morphology and nectar properties	96

4.4.5. Floral scent.....	98
4.4.6. Pollinator observations.....	101
4.5. Discussion	102
4.5.1. Effective reproductive isolation without apparent postmating isolation	102
4.5.2. Geographical and temporal isolation	103
4.5.3. Floral isolation	104
4.5.4. A possible case of pollinator-mediated ecological speciation	105
4.5.5. Conclusion	106
4.6. Acknowledgements	107
 5 Evidence for isolation-by-habitat among populations of an epiphytic orchid species on a small oceanic island	 109
<hr/>	
5.1. Présentation de l'article	111
5.1.1. Résumé.....	111
5.1.2. Abstract	112
5.2. Introduction.....	113
5.3. Materials and methods.....	115
5.3.1. Study area and species	115
5.3.2. Genotyping.....	118
5.3.3. Genetic diversity	118
5.3.4. Genetic differentiation.....	119
5.3.5. Genetic structure.....	120
5.3.6. Differentiation in floral morphology	121
5.3.7. Differentiation in floral scent	122
5.3.8. Geographical and environmental distances between populations.....	123
5.3.9. Effect of environmental and geographical factors on genetic and phenotypic divergence among populations.....	124
5.4. Results	125
5.4.1. Genetic diversity	125
5.4.2. Genetic differentiation.....	126
5.4.3. Genetic structure.....	128
5.4.4. Differentiation in phenotypic traits.....	130
5.4.5. Effect of environmental and geographical factors on genetic and phenotypic divergence among populations.....	133
5.5. Discussion	135
5.5.1. Isolation-by-habitat as a primary factor causing population differentiation in <i>J. rossii</i>	135
5.5.2. Is phenotypic differentiation consistent with genetic differentiation?	137
5.5.3. Are populations of <i>J. rossii</i> undergoing speciation?.....	139
5.6. Acknowledgements	140
 6 Synthèse et discussion générale	 141
<hr/>	
6.1. Synthèse des principaux résultats.....	143
6.2. Un cas probable de spéciation écologique	144

6.2.1. Le rôle des pollinisateurs	144
6.2.2. Le rôle des autres facteurs liés à l'habitat	148
6.2.3. Les modes de spéciation alternatifs	151
6.3. <i>Le continuum de spéciation et les facteurs affectant sa progression</i>	155
6.4. <i>Implications des résultats en terme et de conservation.....</i>	158
6.4.1. Révision de la taxinomie	158
6.4.2. Recommandations de gestion	161
7 Références bibliographiques	163

Liste des Tableaux

Tableau 1.1. Classification des approches permettant de tester la spéciation écologique. La principale prédiction, le résultat attendu et un exemple issu de la littérature sont fournis pour chaque approche. Modifié d'après Nosil (2012).	13
Tableau 1.2. Classification des modes de spéciation selon le type de mécanisme à l'origine de la divergence. Modifié d'après Schluter(2001).....	17
Tableau 1.3. Caractéristiques géologiques et géographiques des îles principales de l'archipel des Mascareignes et diversité spécifique de leur flore angiosperme indigène. Modifié d'après Baider <i>et al.</i> (2010).	25
Tableau 2.1. Moyennes et écart-types (entre parenthèses) des caractères morphologiques utilisés pour l'analyse morphométrique des trois populations de faham échantillonnées (n = nombre d'individus). * : $0,01 < P < 0,05$. ** : $0,001 < P < 0,01$. *** : $P < 0,001$. ns : non significatif. Différentes lettres en exposant sur une même ligne indiquent une différence significative ($p < 0,05$) des moyennes selon le test de Wilcoxon ajusté par la méthode de Bonferroni.	50
Table 3.1. Characteristics of the studied populations of faham.	66
Table 3.2. Mean genetic variability at 13 microsatellites loci per population, per habitat type and per species.....	70
Table 4.1. Characteristics and sampling details of study populations of <i>Jumellea rossii</i> and <i>Jumellea fragrans</i>	88
Table 4.2. Analysis of molecular variance based on 13 microsatellite loci for populations of <i>J. rossii</i> and <i>J. fragrans</i>	93
Table 4.3. Results of hand-pollination experiments to determine postmating isolation between <i>Jumellea rossii</i> and <i>Jumellea fragrans</i> by fruit set and percentage of viable seeds.	95
Table 4.4. Mean, standard deviation of ten morphological measurements and results of ANOVA and nested ANOVA.....	97
Table 4.5. Mean relative amounts [min-max] of the volatile compounds identified in the floral scent emitted at dusk in populations of <i>J. rossii</i> and <i>J. fragrans</i> . R_i : Kovat's retention index. <i>tr</i> : mean relative amount < 0.1	99
Table 4.6. Details of video sessions for each species, each flowering season and each camera system.....	101

Table 5.1. Characteristics of the studied populations of <i>Jumellea rossii</i> in Réunion.	117
Table 5.2. Estimates of genetic diversity at 13 microsatellite loci in 12 populations of <i>Jumellea rossii</i> and means per habitat type.	126
Table 5.3. Estimated number of recent migrants (N_m) per generation between populations of <i>Jumellea rossii</i> . N_m were obtained by multiplying the effective size of the population of origin by recent migration rates per generation. The direction of migration is given from populations in columns (origin) to those in lines (destination).	128
Table 5.4. Posterior model probabilities for models explaining migration rates among populations of <i>Jumellea rossii</i>	128
Table 5.5. Comparison of the ten measured floral traits of <i>Jumellea rossii</i> among habitats [mean \pm s.d.].	132
Table 5.6. Mean relative amounts of the volatile compounds identified in the floral scent of different population of <i>Jumellea rossii</i> emitted at dusk.	133

Liste des Figures

- Figure 1.1.** Schéma explicatif du principe de descendance avec modification proposé par Darwin dans l'Origine des espèces (1859). Les espèces B, C, D, E, G et H s'éteignent ; l'espèce F subit une spéciation par anagenèse ; les espèces A et I subissent des spéciations par cladogenèse..... 4
- Figure 1.2.** Représentation hypothétique des concepts d'espèce et de spéciation selon Darwin. Les différences entre espèces (symboles) sont du même type que celles entre les variétés (couleurs). La formation d'une forte discontinuité dans la distribution des morphologies par extinction des formes intermédiaires (symbolisée par la courbe en pointillés) résulte de la compétition et de la sélection naturelle. Modifiée d'après Mallet (2008b). 5
- Figure 1.3.** Schéma représentant la nature de la divergence entre deux populations durant le processus de spéciation. Trois étapes sont arbitrairement représentées le long du continuum et se différencient par le degré d'isolement reproducteur, de regroupement génétique et de tri des lignées. Modifiée d'après Nosil *et al.* (2009) 8
- Figure 1.4.** Schéma représentant les différents modes de spéciation selon le mécanisme à l'origine de l'isolement reproducteur. Les individus sont représentés par des ronds et les populations par des ellipses. (A) Sélection divergente entre différents environnements (symbolisés par des couleurs différentes) ; (B) accumulations de différentes mutations adaptatives dans le même environnement sélectif ; (C) dérive génétique symbolisée ici par un effet fondateur ; et (D) hybridation suivie de polyploïdisation symbolisé par une augmentation de taille des individus. 19
- Figure 1.5.** Schéma conceptuel illustrant les mécanismes écologiques et évolutifs permettant de relier l'opportunité écologique insulaire (cercles) à la radiation adaptative. La théorie de la spéciation écologique permettrait d'expliquer la transition entre le relâchement écologique et la spéciation (point d'interrogation) par la mise en place d'un isolement reproducteur résultant de l'adaptation à différentes niches écologiques. 21
- Figure 1.6.** Localisation géographique de l'archipel des Mascareignes dans le sud-ouest de l'océan Indien. D'après Jauze (2009). 24
- Figure 1.7.** Carte des températures moyennes annuelles (à gauche ; en °C) et de la pluviométrie annuelle moyenne (à droite ; en mm) à la Réunion. Valeurs normales calculées entre 1981 et 2010. Extrait de <http://www.meteofrance.re/climat/description-du-climat>. 25
- Figure 1.8.** Carte phyto-géographique supposée des habitats naturels de la Réunion (à gauche) et de Maurice (à droite). La distance entre les îles n'est pas à l'échelle. Modifiée d'après Cheke & Hume (2008). 26

Figure 1.9. Représentation schématique du modèle de coévolution entre une orchidée nectarifère et son pollinisateur. Modifiée d'après Johnson & Anderson (2010).	29
Figure 1.10. Chimie du bouquet floral des sections Hadrangis et Humblotiangraecum par rapport à leur syndrome de pollinisation dans leur contexte phylogénétique. Modifiée d'après Micheneau <i>et al.</i> (2010).	31
Figure 1.11. Extraits des arbres phylogénétiques des orchidées angraecoïdes (à gauche ; d'après Micheneau <i>et al.</i> 2008a) et du genre <i>Jumellea</i> (à droite ; d'après Rakotoarivelo <i>et al.</i> 2012) obtenus par consensus majoritaire après analyse bayésienne de la matrice combinée des sequences <i>matK</i> , <i>trnL-F</i> , <i>rps16</i> (à gauche) et <i>matK</i> , <i>trnL-F</i> , <i>rps16</i> , <i>ycf1</i> , <i>nrITS</i> (à droite). Les probabilités postérieures et les valeurs de bootstrap sont respectivement indiquées au-dessus et en-dessous des branches. En vert, les espèces à long éperon ; en jaune et orange, les clades ayant probablement radié aux Mascareignes. A gauche ; <i>J. fragrans</i> = <i>J. rossii</i> ; <i>Jumellea</i> sp. TP203 = <i>J. fragrans</i> ; <i>Jumellea</i> sp. JF85 = <i>J. triquetra</i> ; et <i>Jumellea</i> sp. JF9 = <i>J. bosseri</i> . A droite ; *, specimens collectés aux Comores ; **, specimens collectés aux Mascareignes ; ***, specimens collectés en Afrique tout le reste étant collecté à Madagascar.	33
Figure 2.1. Dessin d'un individu fleuri de faham (<i>Jumellea rossii</i> , dessin : J. Cadet).	45
Figure 2.2. Carte de distribution des populations de faham à La Réunion. Points : populations répertoriées ; Triangles : populations échantillonnées (CL : Cilaos, BV : Basse-Vallée, ML : Mare-Longue) ; Gris clair : zone de végétation préservée ; Gris foncé : distribution probable du faham correspondant aux types d'habitats dans lesquels les espèces ont été observées.	45
Figure 2.3. Illustration des caractères morphologiques floraux mesurés sur les individus de faham. Longueur de l'éperon (EPR), hauteur de la colonne (HC), longueur du labelle (LL), largeur du labelle (lL), longueur du pétale (LP), largeur du pétale (lP), longueur du sépale latéral (LSL), largeur du sépale latéral (lSL), longueur du sépale dorsal (LSD), largeur du sépale dorsal (lSD).	47
Figure 2.4. Résultats de l'Analyse en Composantes Principales dans le plan formé par les axes 1-2 et réalisée sur les données morphologiques (A) végétatives et (B) florales de trois populations naturelles de faham. Les carrés représentent les individus de Cilaos (CL), les triangles ceux de Basse-Vallée (BV) et les ronds ceux de Mare-Longue (ML). Les étiquettes portant les noms des populations correspondent au barycentre du nuage de point formé par les individus de chaque population. Les ellipses quantifient la dispersion des individus d'une population, la longueur des axes égale 1,5 fois l'écart-type des coordonnées des projections sur les axes.	49
Figure 2.5. Dessin d'un individu fleuri de <i>Jumellea fragrans</i> (Du Petit-Thouars, 1822) pouvant constituer le lectotype de l'espèce.	53
Figure 3.1. Population genetic (left) and morphological (right) structure inferred by (A) principal coordinate analysis on pairwise euclidean distances (colours correspond to the	

habitats) and (B) K-mean clustering followed by a discriminant analysis of principal components with clusters as grouping factors. Each individual is shown as a thin vertical line partitioned into K coloured components, representing inferred membership in K clusters. *MB, **RM, ***MA.	71
Figure 3.2. Detection of the best number of genetic (circle) and morphological (triangles) clusters K using K-means algorithm and the Bayesian Information Criterion (BIC).....	72
Figure 3.3. Population genetic (left) and morphological (right) structure inferred by a discriminant analysis of principal components with habitat as grouping factors. Each individual is shown as a thin vertical line partitioned into five coloured components, representing inferred membership in five habitat types.....	73
Figure 3.4. Potential extent of occurrence of each Evolutionary Significant Unit (ESU) inferred from suitable habitat types for each ESU. The green ESU represents <i>J. rossii</i> ; the yellow one represents <i>J. fragrans</i> from lowland rainforest; the orange one represents <i>J. fragrans</i> from semi-dry forest. They could be respectively classified as ‘Least Concern’, ‘Endangered’ and ‘Critically Endangered’.....	75
Figure 4.1. Floral morphology and pollinators of <i>Jumellea rossii</i> (left column) and <i>J. fragrans</i> (right column). (A-B) Details of one flowering stem. (C-D) Details of one flower showing the difference in spur length between species. (E) <i>Chrysodeixis chalcites</i> with pollinaria attached on its tongue and (F) <i>Agrius convolvuli</i> feeding on nectar (pictures taken from video-captures).....	87
Figure 4.2. Estimated distribution of <i>Jumellea rossii</i> (light zones) and <i>Jumellea fragrans</i> (dark zones). Dots represent localities where the species were observed and stars represent study populations of <i>J. rossii</i> (filled symbols) and <i>J. fragrans</i> (open symbols).	89
Figure 4.3. Genetic structure of <i>Jumellea rossii</i> (filled symbols) and <i>Jumellea fragrans</i> (open symbols) inferred from Principal Coordinates Analysis. The first two axes represent 62.8% and 9.3% of the variation, respectively. Each symbol type corresponds to a single population.	94
Figure 4.4. Principal component analysis of ten morphological floral traits of <i>Jumellea rossii</i> (filled symbols) and <i>Jumellea fragrans</i> (open symbols). The first two axes (PC1 & PC2) represent 49.7% and 22.1% of the variation, respectively. Each symbol type corresponds to a single population.	96
Figure 4.5. Distribution of spur length in <i>Jumellea rossii</i> (filled bars; n = 47) and <i>Jumellea fragrans</i> (open bars; n = 28).	97
Figure 4.6. Non-metric multidimensional scaling representation of the scent composition of <i>Jumellea fragrans</i> (open symbols) and <i>Jumellea rossii</i> (filled symbols). Each symbol type corresponds to a single population.....	98

- Figure 5.1.** Location of Réunion and study populations. The top map shows the location of Réunion (in red) in the southwest Indian Ocean. The bottom map shows the location of study populations and the distribution of the three natural habitat types of *Jumellea rossii*. 116
- Figure 5.2.** Principal components analysis of environmental variation between populations of *Jumellea rossii* based on altitude (Alt), monthly mean minimum (Tmin) and maximum (Tmax) temperatures, annual rainfall height (ARH), annual number of rainy days (ARD), maximum daily rainfall (MDR) and Emberger's pluviothermic quotient (EPQ). The colours correspond to the type of habitat, dark blue for the mountain windward rainforest, light blue for the submountain windward rainforest and orange for the leeward rainforest. 124
- Figure 5.3.** Detection of the number of genetic clusters K. (A) Using K-means algorithm and the Bayesian Information Criterion (BIC) for each K with adegenet (Jombart *et al.* 2010). (B) Using the log-likelihood (triangles) and ΔK statistic (squares) according to Evanno *et al.* (2005) averaged over ten runs for each K with InStruct (Gao *et al.* 2007). 129
- Figure 5.4.** Spatial genetic structure of *Jumellea rossii* populations obtained by two different methods. Genetic structure is inferred (A) by a model-based clustering method implemented in InStruct and (B) by discriminant analysis of principal components with habitat type as grouping factor. At each location, pie charts indicate the mean proportion of individual memberships in each cluster for $K = 3$ (A) or each habitat type (B) and their size is proportional to the number of individuals sampled. 130
- Figure 5.5.** Canonical discriminant analysis of 10 morphological floral traits with habitat type as grouping factor. Flowers of one population of each habitat (PF, CL and RBV) are drawn. The colours correspond to the type of habitat, dark blue for the mountain windward rainforest, light blue for the submountain windward rainforest and orange for the mountain leeward rainforest. 131
- Figure 5.6.** Multiple matrix regression with randomization (MMRR) analysis performed on genetic distances. Scatterplots show patterns of isolation-by-distance (A), isolation-by-ecology (B) and the absence of eco-spatial autocorrelation (C) according to (Shafer & Wolf 2013). When correlations are significant (Mantel test, $P < 0.05$), regression lines are drawn. Plot (D) is based on the results of the multiple matrix regression analysis for the effects of both geographical and environmental distances on genetic distances. 134
- Figure 6.1.** Représentation schématique du modèle de spéciation des orchidées par dérivesélection de Tremblay *et al.* (2005) 152
- Figure 6.2.** Schéma synthétique des principaux résultats (A) G'_{ST} moyens entre paires de populations issues du même habitat, d'habitats différents ou d'espèces différentes. (B) Analyse discriminante des composantes principales testant le regroupement génétique des individus selon leur type d'habitat d'origine. (C) Densité de distribution de la longueur de l'éperon. (D) Positionnement multidimensionnel non métrique (NMDS) des

individus en fonction du pourcentage relatif des composés chimiques de leur bouquet floral. (E) Phénologie de la floraison des populations estimée en fonction de l'altitude. Les points correspondent aux observations et les traits représentent la durée estimée de la floraison. (F) Répartition des populations en fonction de l'altitude et du quotient pluviothermique d'Emberger. (B-F) Les couleurs correspondent aux différents types d'habitats..... 155

1 Introduction générale



*‘Les théories sont des filets destinés à capturer ce que nous appelons « le monde » ; [...]
Nous nous efforçons de resserrer de plus en plus les mailles.’*

Karl R. Popper

1.1. Cadre théorique: la spéciation écologique

1.1.1. De Darwin à la définition actuelle de la spéciation écologique

« La sélection naturelle conduit aussi à la divergence des caractères ; car, plus les êtres organisés diffèrent les uns les autres sous le rapport de la structure, des habitudes et de la constitution, plus la même région peut en nourrir un grand nombre. » (Darwin 1859)

Dans l'Origine des espèces (1859), Charles Darwin propose un cadre théorique à la pensée évolutionniste en se basant sur quatre principes. Premièrement, les organismes présentent naturellement des variations individuelles héréditaires ; deuxièmement, les organismes produisent plus de descendants que nécessaire pour les remplacer à la génération suivante ; troisièmement, les ressources limitées créent une «lutte pour l'existence» qui régule la taille de la population, de sorte que la plupart des descendants meurent sans se reproduire ; et quatrièmement, les individus qui survivent et se reproduisent sont, en moyenne, en raison de leurs variations individuelles héréditaires, mieux adaptés à leur environnement local que les individus ne présentant pas ces variations. Compte tenu de ces quatre principes, Darwin propose ce qu'il appelle « la théorie de la descendance avec modification » dans laquelle le mécanisme de la sélection naturelle joue un rôle central dans la formation des espèces. Ainsi, dans la seule figure de L'Origine des espèces (Figure 1.1), Darwin propose un modèle dans lequel il résume l'évolution possible d'une espèce au cours du temps. Il prend l'exemple d'une espèce commune, très répandue et à forte variabilité intraspécifique (l'espèce A). Dans ce modèle, selon le principe de l'avantage résultant de la divergence des caractères (énoncé en introduction de ce paragraphe), cette espèce fixe et accumule dans le temps les variations les plus extrêmes jusqu'à former des variétés distinctes (a1 et m1).

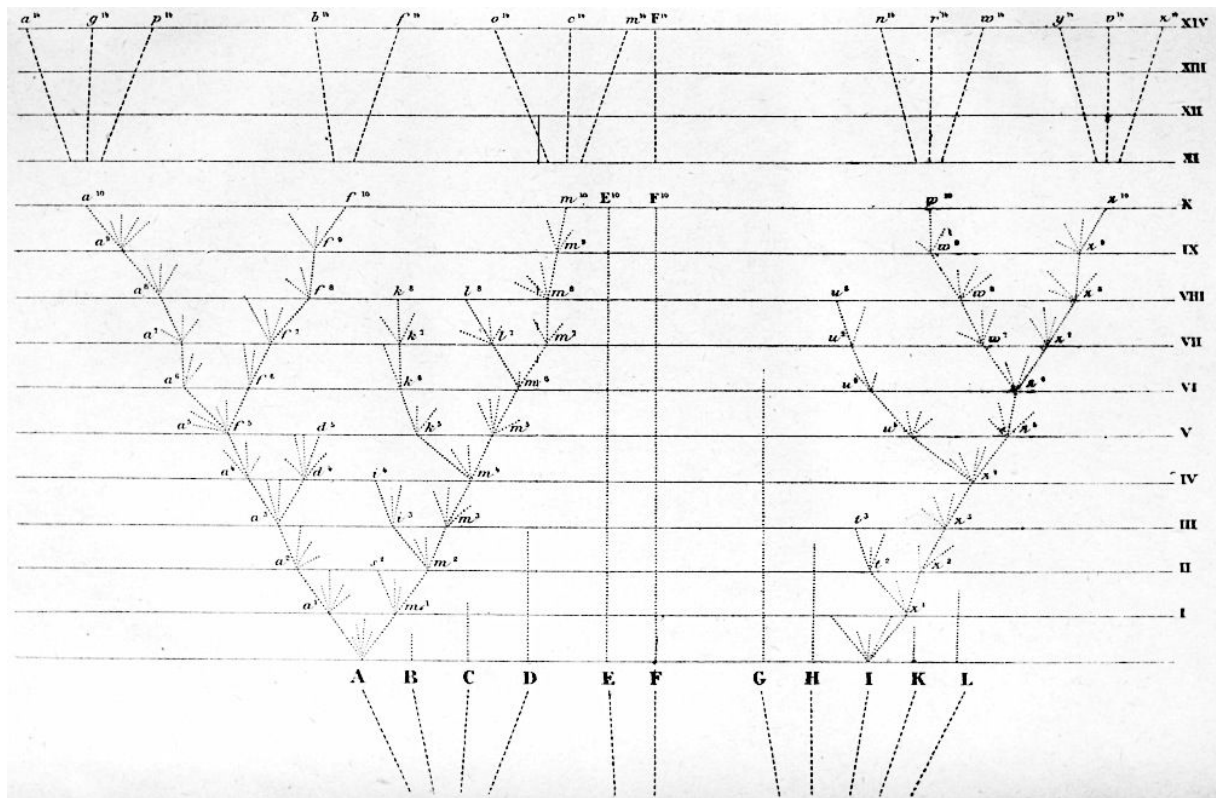


Figure 1.1. Schéma explicatif du principe de descendance avec modification proposé par Darwin dans l'Origine des espèces (1859). Les espèces B, C, D, E, G et H s'éteignent ; l'espèce F subit une spéciation par anagenèse ; les espèces A et I subissent des spéciations par cladogenèse.

Ces variétés peuvent, de la même manière, produire une seule (a1 produit a2) ou deux nouvelles variétés (m1 produit m2 et s2). Ainsi, en considérant un grand nombre de générations, la divergence entre les variétés sélectionnées peut devenir suffisamment grande pour les considérer comme des espèces distinctes (a14 à m14). Cependant, dans son ouvrage, Darwin n'explique pas clairement comment la sélection naturelle peut être à l'origine de la stérilité entre espèces bien qu'il s'agisse alors d'un des critères permettant de définir l'espèce. Cela lui a valu de vives critiques de la part de ses contemporains, y compris de la part de ses défenseurs les plus ardents (Huxley 1860 cité dans Mallet 2008b). Darwin ne considère pas l'isolement reproducteur comme critère nécessaire et suffisant pour définir l'espèce partant du fait qu'il existe des cas de stérilité des croisements au sein de certaines espèces et qu'il existe aussi des espèces distinctes interfertiles. Selon lui, deux variétés deviennent

progressivement des espèces distinctes lorsque l'on observe entre elles un intervalle significatif dans la distribution de leur morphologie (Figure 1.2).

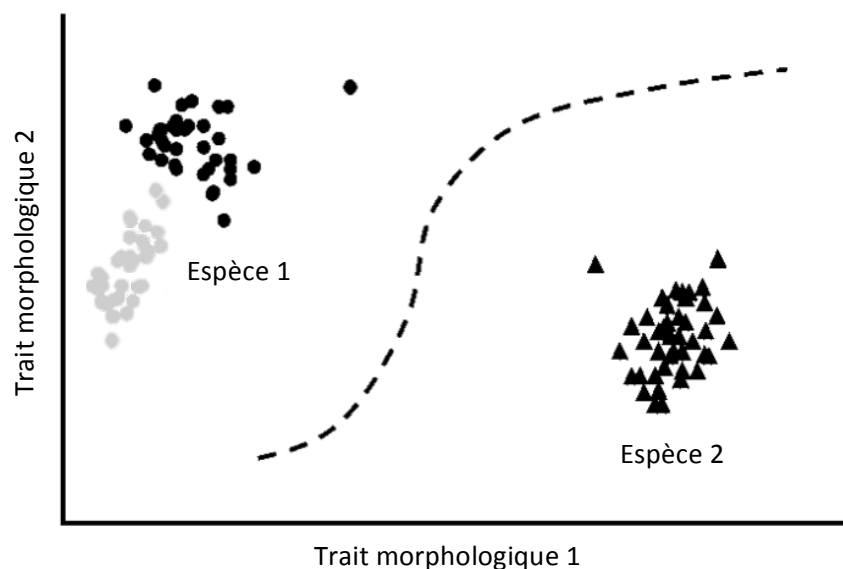


Figure 1.2. Représentation hypothétique des concepts d'espèce et de spéciation selon Darwin. Les différences entre espèces (symboles) sont du même type que celles entre les variétés (couleurs). La formation d'une forte discontinuité dans la distribution des morphologies par extinction des formes intermédiaires (symbolisée par la courbe en pointillés) résulte de la compétition et de la sélection naturelle. Modifiée d'après Mallet (2008b).

L'évolution graduelle de cet intervalle (i.e. la spéciation) provient de la sélection divergente entraînant l'extinction des formes intermédiaires. Cette vision darwinienne de l'espèce n'a pas convaincu la communauté scientifique et paradoxalement, il a depuis été largement accepté que Darwin n'a pas clairement défini l'espèce ni réussi à expliquer l'origine des espèces (Mallet 2008a; b). Aujourd'hui encore, de nombreux biologistes de l'évolution utilisent le concept biologique de l'espèce, définissant l'espèce comme un groupe de populations naturelles interfécondes et reproductivement isolées d'autres groupes semblables (Mayr 1942). De ce point de vue, l'étude de la spéciation revient alors à étudier l'évolution de l'isolement reproducteur, ce qui a probablement contribué à limiter l'étude du rôle probable de la sélection naturelle dans la formation des espèces durant la mise en place de la théorie

synthétique de l'évolution (Schluter 2009). Ainsi Dobzhansky (1940) suggère que les gènes qui sous-tendent les différences phénotypiques entre les populations ont peu de chance d'être la base de l'isolement reproducteur. En outre, selon Mayr (1942), l'isolement géographique est nécessaire à la mise en place de l'isolement reproducteur, que la sélection naturelle soit impliquée ou non. Cependant, à cette même époque, les travaux du botaniste Clausen sur les écotypes suggèrent l'importance de la sélection naturelle dans la mise en place de l'isolement reproducteur (revu dans Lowry 2012). Ce n'est qu'avec la résurgence du débat autour la spéciation sympatrique que le lien entre sélection naturelle et spéciation a ressurgi car celle-ci n'est en effet possible uniquement sous l'hypothèse d'une forte sélection disruptive (Maynard Smith 1966). Cependant, les études menées à cette époque ont tendance à se concentrer sur le contexte géographique de la divergence adaptative plus que sur la mise en place de l'isolement reproducteur (Coyne & Orr 2004). La réconciliation entre la vision darwinienne de la spéciation et le concept biologique de l'espèce a finalement lieu avec le développement de la théorie de la spéciation écologique.

La spéciation écologique est définie par trois composantes essentielles : (1) une source de sélection naturelle divergente ; (2) une forme d'isolement ; et (3) un mécanisme génétique liant la sélection à l'isolement reproducteur. La spéciation écologique considère uniquement les cas où la sélection a une base écologique c'est à dire qu'elle doit agir sur des traits intervenant dans l'interaction des individus avec leur environnement (Rundle & Nosil 2005; Schluter 2009). Le terme environnement est ici considéré dans son sens le plus large et se réfère aux éléments biotiques et abiotiques du milieu (e.g. climat, ressources) ainsi qu'aux interactions intra et interspécifiques (e.g. compétition, prédation, mutualisme). D'autre part, la sélection doit être divergente c'est à dire qu'elle doit agir dans des directions opposées dans différentes populations. Enfin, les traits directement soumis à sélection divergente, ou ceux qui leur sont liés génétiquement, doivent affecter l'isolement reproducteur. Il est

à noter que la spéciation écologique peut se produire dans n'importe quel contexte géographique (allopatrie, parapatie, sympatrie) et que celui-ci est important car il peut influencer la source de la sélection divergente ainsi que la quantité de flux de gènes entre les populations en cours de différenciation (Rundle & Nosil 2005; Nosil *et al.* 2009; Surget-Groba *et al.* 2012).

1.1.2. Le continuum de spéciation

« Les petites différences qui distinguent les variétés d'une même espèce tendent régulièrement à s'accroître jusqu'à ce qu'elles deviennent égales aux grandes différences qui existent entre les espèces d'un même genre, ou même entre des genres distincts. » (Darwin 1859)

En s'appuyant sur son schéma (présenté Figure 1.1), Darwin suggère que les processus adaptatifs régissant l'évolution des populations (microévolution) sont les mêmes que les processus évolutifs à l'origine des espèces (macroévolution), ces derniers agissant sur des pas de temps plus longs. Ainsi, Darwin prétend que la divergence des populations est un processus graduel et continu pouvant dans certains cas aboutir aux discontinuités observées entre les espèces par extinction des formes intermédiaires (Reznick & Ricklefs 2009). Malgré cela, il faudra attendre que la théorie de la spéciation écologique soit suffisamment étayée pour que la nature continue du processus de spéciation soit clairement reconnue (Wu 2001; Butlin *et al.* 2008; Mallet 2008b; Lowry 2012). Ainsi, les degrés de divergence phénotypique et génotypique entre populations peuvent varier quantitativement (Jiggins & Mallet 2000; Drès & Mallet 2002; Nosil 2007; Mallet *et al.* 2007; Thorpe *et al.* 2010; Rymer *et al.* 2010), de même que l'intensité de l'isolement reproducteur (Coyne & Orr 1989; Funk *et al.* 2006; Nosil 2007; Merrill *et al.* 2011), et le tri des lignées (Dopman *et al.* 2005). Ces différents degrés de divergence et d'isolement reproducteur entre populations peuvent être représentés de manière croissante le long d'un continuum

allant de la panmixie jusqu'à l'isolement reproducteur complet et irréversible (Figure 1.3). Si les différents concepts d'espèce peuvent être en désaccord sur les critères permettant de déterminer quand la spéciation est complète (revu dans Coyne & Orr 2004), le cadre conceptuel du continuum de spéciation permet davantage de s'intéresser aux processus mis en jeu en étudiant les facteurs responsables de l'évolution de la divergence des populations le long de ce continuum.

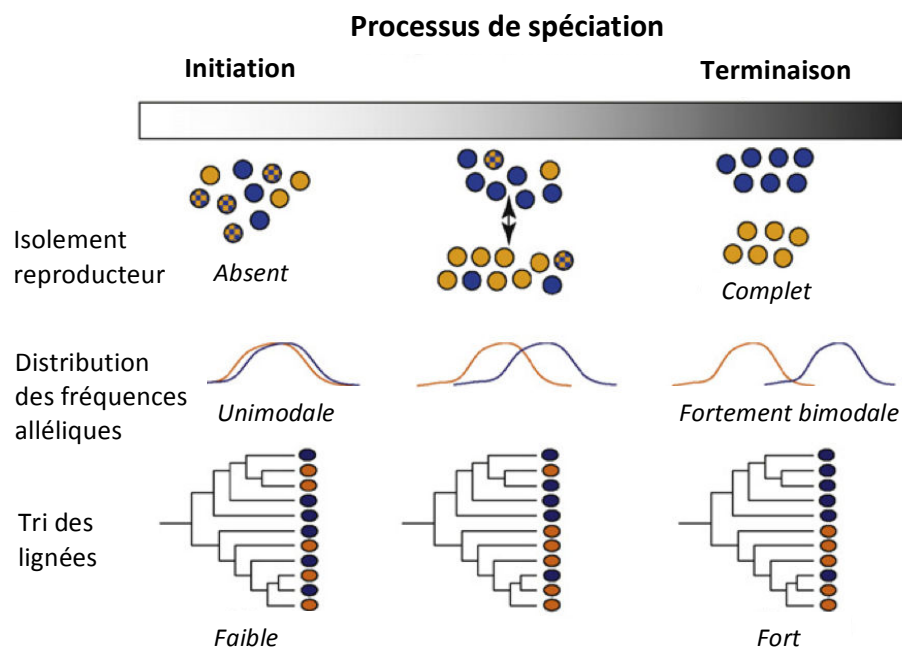


Figure 1.3. Schéma représentant la nature de la divergence entre deux populations durant le processus de spéciation. Trois étapes sont arbitrairement représentées le long du continuum et se différencient par le degré d'isolement reproducteur, de regroupement génétique et de tri des lignées. Modifiée d'après Nosil *et al.* (2009)

Pour aborder cette question de manière pratique, Hendry (2009) a défini quatre étapes le long du continuum de spéciation. L'étape 1 correspond à une variation continue des caractères adaptatifs entre les individus (distribution unimodale) sans isolement reproducteur (panmixie) mais où les individus présentant les caractères extrêmes peuvent être spécialisés dans l'utilisation de ressources différentes. L'étape 2 correspond à une variation partiellement discontinue des caractères (par exemple suivant une distribution bimodale avec chevauchement) avec un faible isolement

reproducteur. L'étape 3 correspond à une variation fortement discontinue des caractères (par exemple suivant une distribution bimodale sans chevauchement) avec un isolement reproducteur fort mais réversible. Enfin, l'étape 4 est atteinte lorsque l'isolement reproducteur devient complet et irréversible. Il est important de noter que les transitions entre ces étapes ne sont pas abruptes ni évidentes car il s'agit d'une division arbitraire d'un continuum. En outre, les transitions entre les étapes ne sont pas inévitables et ne sont pas nécessairement unidirectionnelles (Hendry 2009).

1.1.3. Les mécanismes de la spéciation écologique

Il existe de nombreux mécanismes pouvant être impliqués dans la spéciation écologique car chacune de ses trois composantes essentielles (sélection naturelle, isolement reproducteur et leur lien génétique) peut prendre diverses formes non mutuellement exclusives et pouvant agir en synergie (pour une revue exhaustive, voir Nosil 2012).

Ainsi, la sélection naturelle peut résulter de différences environnementales entre populations, favorisant ainsi différents traits selon les populations. Cela inclut le cas particulier de la sélection sexuelle où les traits sélectionnés interviennent dans la reproduction sexuée (Seehausen *et al.* 2008). La sélection naturelle peut aussi dépendre d'interactions écologiques entre les populations comme la compétition, la prédation, les mutualismes (Doebeli & Dieckmann 2000). Dans ce cas, les aires de répartition des populations doivent être au moins partiellement chevauchantes et la sélection naturelle est généralement fréquence-dépendante. Cela inclut les cas particuliers de sélection favorisant directement l'isolement prézygotique après contact secondaire (mécanisme de renforcement ; Servedio & Noor 2003) et de sélection disruptive pouvant théoriquement provoquer la spéciation sympatrique (Turelli *et al.* 2001).

Dans tous les cas, la sélection divergente provoque l'adaptation locale des populations et réduit par conséquent la valeur sélective des potentiels migrants et hybrides entre ces populations par incompatibilité écologique entre le migrant (ou l'hybride) et son environnement (Nosil *et al.* 2005; Sobel *et al.* 2010). Ces baisses de valeur sélective des migrants et des hybrides peuvent être considérées comme des formes d'isolement reproducteur (respectivement pré et postzygotique). En effet, elles limitent le flux de gènes entre les populations en divergence en réduisant la probabilité de reproduction et la viabilité (ou fertilité) des hybrides (Nosil *et al.* 2005). Ces deux formes d'isolement peuvent être regroupées sous le terme d'isolement écogéographique et jouent probablement un rôle important dans de nombreux cas de spéciation écologique (Sobel *et al.* 2010). Néanmoins, la sélection divergente basée sur l'écologie peut entraîner la mise en place d'autres types de barrières reproductives pré et postzygotiques comme l'isolement temporel, l'isolement sexuel, l'isolement gamétique ou encore l'incompatibilité génomique (Coyne & Orr 2004).

Enfin, un mécanisme génétique doit nécessairement intervenir pour que la sélection divergente sur les traits phénotypiques soit transmise aux traits responsables de l'isolement reproducteur. Lorsque les deux types de traits sont contrôlés par un même gène (ou groupe de gènes), on parle d'effet pléiotropique (Servedio *et al.* 2011). Si les gènes sont différents, la transmission a lieu à condition qu'il existe un déséquilibre de liaison entre ces gènes (Smadja & Butlin 2011).

Un exemple concret de spéciation écologique peut être fourni par le mimule tacheté (*Mimulus guttatus*) qui présente deux écotypes différenciés par leur tolérance à la contamination du sol en cuivre. Des expériences de croisements contrôlés ont montré que l'allèle responsable de la tolérance au cuivre devient létal chez les hybrides F1 issus des croisements entre écotypes (MacNair & Christie 1983). Ce résultat montre que l'isolement reproducteur postzygotique est dans ce cas un effet pléiotropique de l'adaptation aux sols contaminés par le cuivre.

1.1.4. Les facteurs affectant la progression de la spéciation écologique

Différents facteurs peuvent avoir une influence sur le degré de divergence entre taxons et donc sur la progression de la spéciation écologique le long du continuum de spéciation. Il est possible de les séparer en deux catégories : les facteurs écologiques et les facteurs non-écologiques.

Les facteurs écologiques sont principalement liés à la nature des différences écologique entre les taxons. Ainsi, la divergence entre deux taxons sera faible s'ils sont faiblement différenciés le long d'une seule dimension de leur niche écologique. Pour que la spéciation soit complète, les deux taxons doivent être fortement différenciés sur cette même dimension ou différenciés sur un nombre important de dimensions de leurs niches écologiques (Funk *et al.* 2006; Seehausen *et al.* 2008; Nosil *et al.* 2009). La nature de la sélection divergente affecte aussi la progression de la spéciation écologique. La divergence est favorisée lorsque la sélection divergente agit sur un nombre important de traits écologiques ou lorsqu'elle agit fortement sur un seul trait. Les deux types de différenciation écologique (extrême ou multidimensionnelle) peuvent provoquer les deux types de sélection. Par exemple, une différence écologique extrême le long d'une seule dimension de niche peut aboutir à une forte sélection divergente sur un trait ou peut impliquer de nombreux traits. Enfin, plus le lien génétique entre les traits soumis à sélection divergente et les traits responsables de l'isolement reproducteur est direct, plus la spéciation écologique sera favorisée.

D'autre part, la progression de la spéciation écologique peut être influencée par des facteurs non écologiques. La distance spatiale et les barrières géographiques constituent des barrières aux flux de gènes et peuvent donc favoriser la divergence entre taxons. Ces facteurs ont été étudiés en détail chez le phasme *Timema cristinae* qui présente deux morpho-écotypes, chacun étant adapté à une espèce de plante hôte différente en réponse à la prédation. La disposition géographique des deux types

d'hôtes (allopatrie vs parapatric) contrôle le taux de migration entre écotypes et par conséquent la fréquence de morphes inadaptés au sein de chaque population. Lorsque la fréquence du morphe inadapté est importante dans une population, le flux de gènes entre écotypes différents est fort, ce qui a pour effet de contraindre la divergence adaptative entre les écotypes (Bolnick & Nosil 2007). Par ailleurs, le temps est aussi un facteur pouvant influencer la spéciation. Plus le nombre de générations depuis le début du processus de divergence est important, plus l'isolement reproducteur entre les populations divergentes est fort (Coyne & Orr 1989, 2004).

1.1.5. L'étude de la spéciation écologique

Il existe cinq types d'approches permettant de tester la spéciation écologique qui correspondent à cinq prédictions de cette théorie (Nosil 2012). Les prédictions associées à chaque approche ainsi que des exemples sont présentés dans le Tableau 1.1. Cette diversité d'approches est indispensable afin de tester la spéciation chez différents taxons car leur applicabilité varie suivant les modèles biologiques étudiés. Le choix se fait selon le nombre de paires de taxons/populations disponibles, selon la connaissance *a priori* de traits soumis à sélection divergente ou encore selon la possibilité de mettre en place certains protocoles expérimentaux (e.g. les transplantations réciproques).

L'approche comparative consiste à tester la corrélation entre la divergence écologique et l'intensité de l'isolement reproducteur en utilisant plusieurs paires de taxons et en contrôlant statistiquement l'effet du temps écoulé depuis leur divergence. Cette approche nécessite donc trois types de mesures : la divergence écologique, l'isolement reproducteur et la distance génétique neutre entre les taxons comme indicateur du temps de divergence. Cette approche a été appliquée à grande échelle sur plus de 500 paires d'espèces de plantes, de vertébrés et d'invertébrés (voir chapitre 1.1.6 ; Funk *et al.* 2006)

Tableau 1.1. Classification des approches permettant de tester la spéciation écologique. La principale prédiction, le résultat attendu et un exemple issu de la littérature sont fournis pour chaque approche. Modifié d’après Nosil (2012).

Type d’approche	Prédiction	Résultat attendu	Exemple
Comparative	La divergence écologique favorise l’IR	L’IR est positivement corrélé à la divergence écologique indépendamment de l’habitat	Funk <i>et al.</i> 2006
Traits magiques	Les traits soumis à la sélection divergente provoquent aussi l’IR	Les traits soumis à la sélection divergente contribuent à l’isolement sexuel	Whitehead & Peakall 2014
Valeur sélective	La sélection divergente entraîne l’adaptation locale	La valeur sélective relative des migrants ou des hybrides est réduite par maladaptation de leur phénotype à l’environnement	Lowry <i>et al.</i> 2008
Flux de gènes	La divergence adaptative réduit le flux de gènes	La différenciation phénotypique adaptative est positivement corrélée à la différenciation génétique neutre	Ogden & Thorpe 2002
Phylogénétique	Les événements de spéciation impliquent un shift écologique	Les espèces sœurs présentent des niches écologiques différentes	van der Niet & Johnson 2009

Abréviation : IR, isolement reproducteur.

L’approche basée sur les traits revient à tester si des traits phénotypiques responsables de l’adaptation locale agissent aussi sur l’isolement reproducteur. Ces traits sont communément appelés des ‘traits magiques’ (Servedio *et al.* 2011) et doivent être clairement identifiés pour pouvoir mener cette approche, ce qui n’est pas toujours possible. La composition chimique du bouquet floral peut dans certains cas représenter un trait magique. Par exemple, certains composés chimiques du bouquet floral intervenant dans l’attraction des pollinisateurs peuvent être responsables à eux seuls de l’isolement reproducteur entre espèces proches (Peakall & Whitehead 2014; Whitehead & Peakall 2014).

L'approche basée sur la valeur sélective permet de tester l'isolement écopéographique qui est une conséquence directe de la spéciation écologique (Sobel *et al.* 2010). Cette approche est souvent expérimentale et nécessite la mise en place de transplantations réciproques afin de mesurer la valeur sélective des individus issus de populations divergentes (et/ou des hybrides entre ces populations) dans les différents habitats. Par exemple, Lowry *et al.* (2008) ont montré que l'isolement reproducteur entre les écotypes côtiers et terrestres de *Mimulus guttatus* résulte principalement d'un isolement écopéographique par adaptation aux embruns et à la sécheresse estivale respectivement. Cependant, cette approche ne permet pas toujours d'identifier les traits soumis à sélection.

L'approche basée sur le flux de gènes consiste à tester si la différenciation génétique neutre est la conséquence de la divergence adaptative ce qui résulte en un patron d'isolement par l'écologie (IBE, *sensu* Shafer & Wolf 2013) par opposition avec l'isolement par la distance (IBD) dans lequel seul la distance géographique entre populations détermine le flux de gènes (Wright 1946). L'IBE peut être abordé de deux manières différentes. Lorsque les traits adaptatifs sont connus, il est possible de tester l'isolement par l'adaptation (IBA) par la corrélation entre la différenciation génétique neutre et la différenciation phénotypique adaptative. Lorsque ces traits ne peuvent pas être déterminés, ce sont les différences environnementales qui sont mesurées testant alors un patron d'isolement par l'environnement (voir chapitre 5).

Enfin, la dernière approche permettant de tester la spéciation écologique est l'approche phylogénétique qui consiste à tester l'association entre les changements écologiques et les événements de spéciation dans la phylogénie d'un taxon donné. De cette manière, van der Niet & Johnson (2009) ont déterminé la fréquence et la nature des changements écologiques pour 188 paires d'espèces de la région floristique du Cap issues de six familles différentes. Les paires d'espèces sont associées à 80% à un ou plusieurs changements écologiques (habitat et pollinisateur principalement).

1.1.6. L'importance de la spéciation écologique dans la nature

La plupart des avancées réalisées dans la description des mécanismes de la spéciation écologique et des facteurs associés provient de l'étude d'un nombre relativement restreint de taxons, principalement les poissons et les insectes qui représentent à eux deux plus de 50% des 132 études originales publiées entre 1998 et 2008 ayant pour mot clé '*ecological speciation*' (Hendry 2009). Parmi ces études, la large majorité (82,6%) conclut que leurs résultats confirment la spéciation écologique alors que seulement 7.6% d'entre elles la rejette. Le reste des études (9.9%) considère que leurs résultats ne permettent pas de conclure. Cependant, après examen de ces études au regard des critères permettant de confirmer la spéciation écologique, il s'avère que seulement 36.4% de ces études seraient suffisamment robustes pour soutenir ce mode de spéciation (Hendry 2009). Cette revue critique de la spéciation écologique insiste particulièrement sur le fait que les études confondent souvent 'avoir des résultats en accord avec la spéciation écologique' et 'avoir des résultats prouvant la spéciation écologique'. Cependant, toutes les études considérées dans cette revue ont probablement choisi leur système d'étude avec un *a priori* fort sur la spéciation écologique ce qui peut introduire un biais statistique dans l'estimation de l'importance de ce mode de spéciation. Pour éviter ce biais, Funk *et al.* (2006) ont travaillé sur des jeux de données initialement collectés pour des études comparatives sur la relation entre l'isolement reproducteur et le temps de divergence (revues dans Coyne & Orr 2004). Ces études ont l'avantage de couvrir un large spectre d'organismes (plantes, insectes, poissons, amphibiens, oiseaux) et surtout de ne pas considérer l'aspect écologique dans le choix du modèle. Après avoir quantifié la divergence écologique (indépendamment du temps de divergence) entre plus de 500 paires d'espèces utilisées dans ces études, Funk *et al.* (2006) ont montré une forte corrélation positive significative entre la divergence écologique et l'isolement reproducteur sur l'ensemble des taxons. Cette étude ne prouve pas directement que la spéciation écologique est impliquée dans les taxons étudiés mais suggère un rôle

important des processus écologiques dans la spéciation sur un large échantillon aléatoire de taxons. Une autre revue montre que le nombre de cas d'isolement reproducteur dû à la sélection divergente est au moins aussi fort que le nombre de cas où l'isolement reproducteur n'a pas de cause identifiable, ce qui suggère que la spéciation écologique pourrait être commune dans la nature (Schluter 2009).

1.1.7. Les mécanismes alternatifs

Depuis la définition du concept biologique de l'espèce, le contexte géographique dans lequel se met en place l'isolement reproducteur entre les populations divergentes permet de classer les différents modes de spéciation (Coyne & Orr 2004). Cette classification se base sur le fait que l'isolement géographique réduit fortement le flux de gènes et permet ainsi la mise en place d'isolement reproducteur (Mayr 1942). Cela va d'un isolement géographique complet où le flux de gènes est nul (allopatrie) à un isolement géographique inexistant où le flux de gènes est potentiellement illimité (sympatrie). Entre les deux, on trouve de nombreuses situations intermédiaires, tant en ce qui concerne l'isolement géographique que le niveau de flux de gènes (parapatricie). Depuis plusieurs années, cette classification est fortement remise en cause notamment par l'existence de cas de spéciation sans rupture de flux de gènes (Nosil 2008; Fitzpatrick *et al.* 2008, 2009). Le premier problème soulevé est que cette classification repose principalement sur la biogéographie des taxons et met en second plan les critères démographiques ou écologiques comme la probabilité de croisement ou de migration entre les populations divergentes. Le deuxième problème est lié à l'échelle spatiale d'observation (Fitzpatrick *et al.* 2008). Deux espèces distinctes peuvent être présentes sur une même aire géographique (sympatrie) et être adaptées chacune à un micro-habitat particulier (hôtes, types de sol différents, ...), ce qui fait qu'à une échelle plus fine, leurs aires de distribution ne se chevauchent pas (allopatricie). Enfin, le dernier problème posé par la classification géographique des modes de spéciation est que le degré de divergence spatiale entre les populations en

divergence peut varier durant le processus de spéciation. Ainsi, l'isolement reproducteur entre deux populations peut être initié en allopatrie pour se compléter en sympatrie et cela malgré des flux de gènes. Face à ces problèmes liés à la classification de la spéciation selon des modes géographiques, des évolutionnistes ont préféré utiliser les mécanismes régissant l'évolution de l'isolement reproducteur comme critère de classification (Schluter 2001). Le Tableau 1.2 présente les quatre modes de spéciation classiquement reconnus correspondant à quatre causes initiales de la divergence.

Tableau 1.2. Classification des modes de spéciation selon le type de mécanisme à l'origine de la divergence. Modifié d'après Schluter(2001).

Mode de spéciation	Description	Exemple de mécanisme à l'origine de l'IR	Prédictions
Écologique	La sélection divergente liée à l'écologie provoque l'IR	Sélection contre les migrants ou les hybrides	IR corrélé positivement à la divergence écologique et adaptative
Mutations	Différentes mutations avantageuses mais incompatibles sont sélectionnées dans différentes populations sous sélection uniforme	Incompatibilité suite à des conflits sexuel ou génétique (e.g. une discordance cyto-nucléaire)	IR non corrélé la divergence écologique mais corrélé à l'intensité du conflit
Dérive génétique	La dérive génétique provoque l'IR	Dérive génétique lors d'effets fondateurs	IR corrélé au nombre de goulots d'étranglement ou au temps depuis l'événement fondateur
Hybridation	L'hybridation et la polyploïdisation provoquent l'IR	Hybridation entre deux espèces (allopolyploïdisation)	Spéciation rapide et fort isolement postzygotique

Abréviation : IR, isolement reproducteur

Deux modes de spéciation impliquent la sélection naturelle comme cause initiale. Dans le cas de la spéciation écologique, la sélection est divergente (Figure 1.4A). Cependant, il est possible que la sélection naturelle uniforme (même environnement sélectif dans différentes populations) favorise la divergence lorsque différentes mutations avantageuses apparaissent dans différentes populations (Turelli *et al.* 2001 ; Figure 1.4B). Les deux autres modes de spéciation impliquent soit la dérive génétique soit la polyploïdisation par hybridation (Figures 1.4C-D) comme cause initiale de la divergence mais n'empêchent pas la sélection naturelle d'agir plus tard dans le processus de spéciation notamment lors d'un éventuel contact secondaire (Turelli *et al.* 2001). La spéciation par dérive génétique concerne soit des populations isolées géographiquement suffisamment longtemps pour permettre la mise en place d'isolement reproducteur, soit des effets fondateurs. Ce mode de spéciation apparaît difficilement acceptable d'un point de vue théorique notamment car la mise en place d'isolement reproducteur par dérive uniquement apparaît peu probable. En effet, la plupart des traits impliqués dans l'isolement reproducteur sont soumis à sélection et seul d'importants goulets d'étranglement permettent d'atténuer l'effet de la sélection sur ces traits (Turelli *et al.* 2001). De plus, le temps nécessaire à la dérive pour mettre en place un isolement reproducteur est théoriquement très long et même une faible sélection peut limiter son effet (Sobel *et al.* 2010). De ce fait, il existe très peu d'études empiriques mettant en évidence un isolement reproducteur résultant uniquement de la dérive génétique (Coyne & Orr 2004). Bien que la dérive seule semble rarement pouvoir provoquer la mise en place d'isolement reproducteur, certains modèles théoriques, confirmés empiriquement, indiquent que lors d'évènements fondateurs, l'interaction entre la dérive génétique et la sélection naturelle peut favoriser la spéciation par effet fondateur (Templeton 2008). Cela permet de mettre en évidence les limites de cette classification des modes de spéciation qui ne fait d'ailleurs pas l'unanimité parmi les évolutionnistes (Sobel *et al.* 2010). Dans cette thèse, la classification des modes de spéciation selon le mécanisme à

l'origine de l'isolement reproducteur sera utilisée tout en considérant que les différents mécanismes peuvent interagir durant la divergence et la mise en place des barrières reproductives.

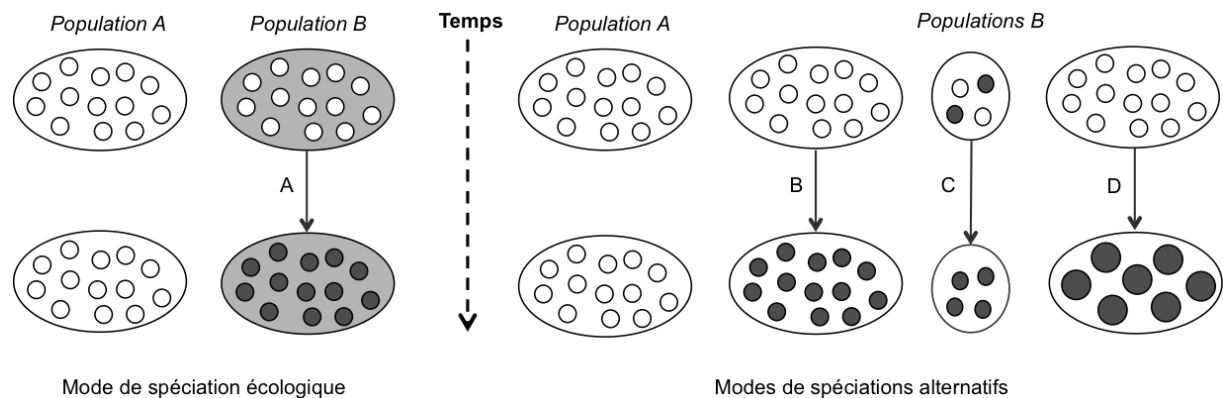


Figure 1.4. Schéma représentant les différents modes de spéciation selon le mécanisme à l'origine de l'isolement reproducteur. Les individus sont représentés par des ronds et les populations par des ellipses. (A) Sélection divergente entre différents environnements (symbolisés par des couleurs différentes) ; (B) accumulations de différentes mutations adaptatives dans le même environnement sélectif ; (C) dérive génétique symbolisée ici par un effet fondateur ; et (D) hybridation suivie de polyploïdisation symbolisée par une augmentation de taille des individus.

1.2. La spéciation écologique dans les systèmes insulaires

1.2.1. Intérêt dans l'étude de la spéciation en milieu insulaire

La flore et la faune insulaires constituent depuis longtemps des sujets de prédilection pour les biologistes et ont largement contribué au développement de la pensée évolutionniste et écologique. Les observations menées par Darwin dans l'archipel des Galápagos lors de son célèbre voyage à bord du Beagle ou par Wallace dans l'archipel indonésien ont été décisives dans l'élaboration la théorie de l'évolution par la sélection naturelle (Darwin 1859; Wallace 1880). Depuis, les systèmes insulaires ont contribué à démontrer le rôle de l'isolement géographique dans la spéciation (Mayr 1942), à étudier l'évolution des systèmes de reproduction (Baker 1955), à concevoir la théorie de l'équilibre dynamique (MacArthur & Wilson 1967), à étudier

les processus de radiation adaptative (Carlquist 1974), ou encore à estimer l'impact des invasions biologiques (Vitousek 1988). Les îles océaniques constituent donc de véritables laboratoires naturels pour les scientifiques étudiant l'évolution biologique et l'écologie.

Plusieurs raisons peuvent expliquer cette particularité des systèmes insulaires. Les îles océaniques forment des systèmes géographiques isolés, aux frontières bien délimitées et relativement clos (Walter 2004). Elles résultent toutes de phénomènes volcaniques en mer (point chaud, dorsale médio-océanique ou zone de subduction) et n'ont donc jamais été en contact avec une masse continentale (Whittaker 1998). Malgré leur petite surface, elles peuvent présenter de fortes variations topographiques, climatiques et édaphiques leur conférant un grand nombre d'habitats potentiels (Whittaker *et al.* 2008).

Ces caractéristiques des îles océaniques ont de multiples conséquences biologiques et écologiques sur la colonisation et l'établissement des populations. Dans un premier temps, l'isolement géographique limite la possibilité de colonisation aux espèces à forte capacité de dispersion. Cet effet de filtrage est à l'origine de la faible richesse spécifique des écosystèmes insulaires relativement aux continents déjà remarquée par Darwin (1859). Il est aussi à l'origine d'un déséquilibre taxinomique des communautés insulaires dans lesquelles les espèces à forte capacité de dispersion sont souvent surreprésentées (Whittaker 1998). Par exemple, la disharmonie floristique peut être illustrée par la forte représentation des orchidées à la Réunion, dont les graines sont facilement dispersées par le vent (Thébaud *et al.* 2009). Dans un second temps, les conditions insulaires permettent un relâchement écologique des espèces colonisatrices provoquant de nombreux ajustements écologiques et évolutifs (Cox & Ricklefs 1977). Ce relâchement écologique résulte de plusieurs facteurs propres aux écosystèmes insulaires regroupés sous le terme d'opportunité écologique (Yoder *et al.* 2010). D'une part la faible richesse spécifique en comparaison aux écosystèmes d'origine provoque

un relâchement des interactions interspécifiques (prédation, compétition, parasitisme,...) permettant le développement de populations relativement denses et donc le renforcement de la compétition intraspécifique (Losos 2010). D'autre part, la diversité d'habitats associée à la faible richesse spécifique rendent accessibles de nombreuses niches écologiques vacantes et peuvent favoriser l'élargissement des niches des espèces colonisatrices (Cox & Ricklefs 1977; Levin 2004; Steinbauer *et al.* 2012). Dans certains cas, l'opportunité écologique peut, via le mécanisme de relâchement écologique, aboutir à la spéciation et expliquerait en partie les phénomènes de radiation adaptative (Figure 1.5 ; Losos & de Queiroz 1997; Harmon *et al.* 2008; Parent & Crespi 2009). Cependant, les mécanismes permettant la mise en place de l'isolement reproducteur entre populations après une différenciation de niche écologique restent souvent inconnus surtout si l'on considère les îles de faible superficie dans lesquelles le flux de gènes entre populations divergentes peut rester important (Yoder *et al.* 2010). Dans ce contexte, le cadre conceptuel de la spéciation écologique permet d'étudier spécifiquement le lien entre les facteurs écologiques et la mise en place de l'isolement reproducteur.

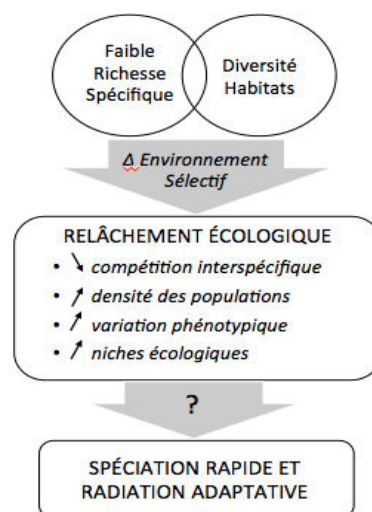


Figure 1.5. Schéma conceptuel illustrant les mécanismes écologiques et évolutifs permettant de relier l'opportunité écologique insulaire (cercles) à la radiation adaptative. La théorie de la spéciation écologique permettrait d'expliquer la transition entre le relâchement écologique et la spéciation (point d'interrogation) par la mise en place d'un isolement reproducteur résultant de l'adaptation à différentes niches écologiques.

1.2.2. Les exemples connus de spéciation écologique en milieu insulaire

La spéciation écologique, en tant que cadre conceptuel relativement récent, a peu été utilisée dans l'étude des processus de spéciation insulaire. Néanmoins, les radiations adaptatives ont largement été étudiées dans certains archipels et peuvent fournir des exemples de spéciation écologique. Un des exemples les plus célèbres concerne les pinsons de Darwin, *Geospiza* spp., dans l'archipel des Galápagos. Sur l'île de Santa Cruz, la différenciation de niche écologique a été mise en évidence par des distributions non chevauchantes de la hauteur du bec entre deux espèces proches : *Geospiza fuliginosa*, à petit bec ; et *G. fortis*, à bec plus gros (Abbott *et al.* 1977). Cette divergence résulterait de la compétition pour l'accès à la ressource, le bec de chaque espèce étant spécialisé pour se nourrir de graines de tailles différentes (Schluter & Grant 1984). Par effet pléiotropique, les différentes tailles de becs distinguent aussi les espèces par leurs vocalises ce qui influe donc sur le choix des partenaires et participe à l'isolement reproducteur (Podos 2001).

D'autre part, l'étude des radiations adaptatives par une approche phylogénétique permet de tester si les événements de spéciation (espèces sœurs) sont accompagnés de changements de niche écologique. L'archipel d'Hawaii, parmi les plus étudiés, fournit de nombreux exemples de phylogénies détaillées de clades ayant radié. Les exemples les plus flagrants concernent les plantes du genre *Cyanea* (Givnish *et al.* 2009), les araignées du genre *Teragnatha* (Gillespie *et al.* 1997) ou encore les drosophiles (Kambyzellis *et al.* 1995) dont les phylogénies suggèrent que la sélection divergente entre habitats contrastés est à l'origine des radiations adaptatives et agit en parallèle sur les différentes îles de l'archipel.

Plus récemment plusieurs études menées dans différentes îles océaniques ont clairement testé la spéciation écologique en s'intégrant dans le cadre conceptuel présenté au chapitre 1.1. Les travaux de Papadopoulos *et al.* (2011, 2013) sur neuf espèces réparties en trois genres non apparentés (*Metrosideros*, *Coprosma* et *Howea*)

indiquent que la spéciation écologique est sans doute commune sur l'île Lord Howe au large de l'Australie. Pour cela, ils ont mis en évidence (1) une divergence génétique et phénotypique entre les espèces sans isolement géographique significatif, (2) des signatures génétiques de sélection divergente entre les espèces et d'adaptation locale, (3) une divergence écologique des espèces au sein de chaque genre associée à de l'exclusion compétitive et (4) un rôle probable de la sélection contre les hybrides comme isolement reproducteur. En appliquant l'approche par flux de gènes (voir chapitre 1.1.5) pour chacune de ces neuf espèces, il apparaît qu'elles présentent toutes un patron d'isolement par l'environnement ce qui correspond au patron attendu sous l'hypothèse de spéciation écologique (Papadopoulos *et al.* 2014).

Enfin, le cas du lézard *Anolis roquet*, endémique de Martinique, illustre bien l'intérêt de l'étude de la spéciation écologique pour expliquer certains patrons de diversité intraspécifique en milieu insulaire. D'un point de vue géologique, la Martinique était formée à l'origine de quatre proto-îles séparées qui ont favorisé l'évolution en allopatrie de différentes lignées d'*A. roquet* durant plus de sept millions d'années (Thorpe & Stenson 2002). Aujourd'hui en contact secondaire, il apparaît que le flux de gènes entre ces lignées est élevé et donc que l'isolement géographique prolongé n'a pas été suffisant pour provoquer la spéciation (Ogden & Thorpe 2002). En revanche, la combinaison de la divergence entre lignées et de la sélection divergente entre les habitats côtiers et montagnards de l'île semble être à l'origine de la différenciation génétique et phénotypique d'*A. roquet* en Martinique (Thorpe *et al.* 2010).

1.2.3. Le cas des Mascareignes

Situé au sud-ouest de l'océan Indien, l'archipel des Mascareignes regroupe trois îles océaniques : la Réunion, Maurice et Rodrigues, distantes respectivement de 700, 900 et 1400 km des côtes est de Madagascar (Figure 1.6). Ces îles se caractérisent par des

superficies, des âges et des reliefs différents (Tableau 1.3). Cependant, les trois îles sont soumises au même climat tropical humide qui se caractérise par des températures relativement chaudes toute l'année. Cependant, deux saisons peuvent être distinguées : la saison chaude et humide (de novembre à mars) et la saison fraîche et sèche (d'avril à octobre). La différence entre ces deux saisons est d'autant plus marquée que le relief est important. En effet, les alizés de secteur est s'élèvent au contact des reliefs et y provoquent de fortes précipitations (côtes au vent). Une fois les plus haut reliefs passés, ils deviennent descendants, secs voire desséchants (côte sous le vent). Cet effet de foehn est d'autant plus fort que le relief est important et perpendiculaire à la direction des vents.

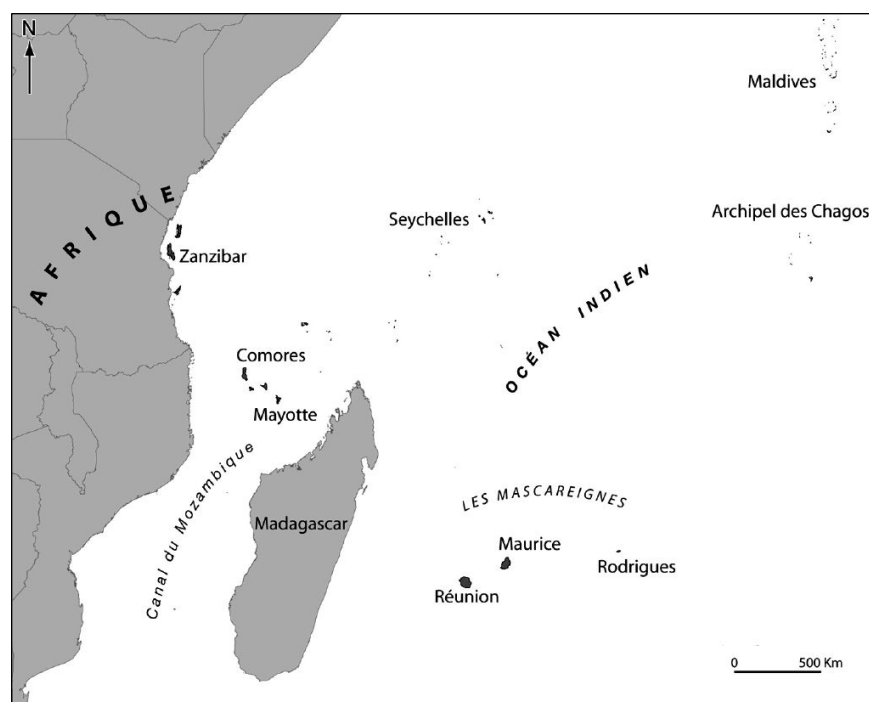


Figure 1.6. Localisation géographique de l'archipel des Mascareignes dans le sud-ouest de l'océan Indien. D'après Jauze (2009).

Tableau 1.3. Caractéristiques géologiques et géographiques des îles principales de l'archipel des Mascareignes et diversité spécifique de leur flore angiosperme indigène. Modifié d'après Baider *et al.* (2010).

Île	Coordonnées géographiques	Origine géologique	Âge ¹ (Ma)	Superficie (km ²)	Altitude (m)	Nombre d'espèces (%endémiques ²)
Réunion	21°09'S 55°30'E	Point chaud	2,1	2512	3070	550 (30%)
Maurice	20°18'S 57°34'E	Point chaud	7,8	1865	828	691 (39%)
Rodrigues	19°43'S 63°25'E	Zone de fracture	1,5	104	398	150 (31%)

¹ Âges estimés par datation des plus anciennes coulées de lave observées. Cependant, des données récentes suggèrent des âges beaucoup plus anciens pour Maurice et Rodrigues (~ 8-15 Ma ; Thébaud *et al.* 2009). ² Endémiques strictes.

A la Réunion, le relief est important et globalement orienté nord-sud. L'asymétrie climatique entre l'est et l'ouest est donc très marquée (Figure 1.7).

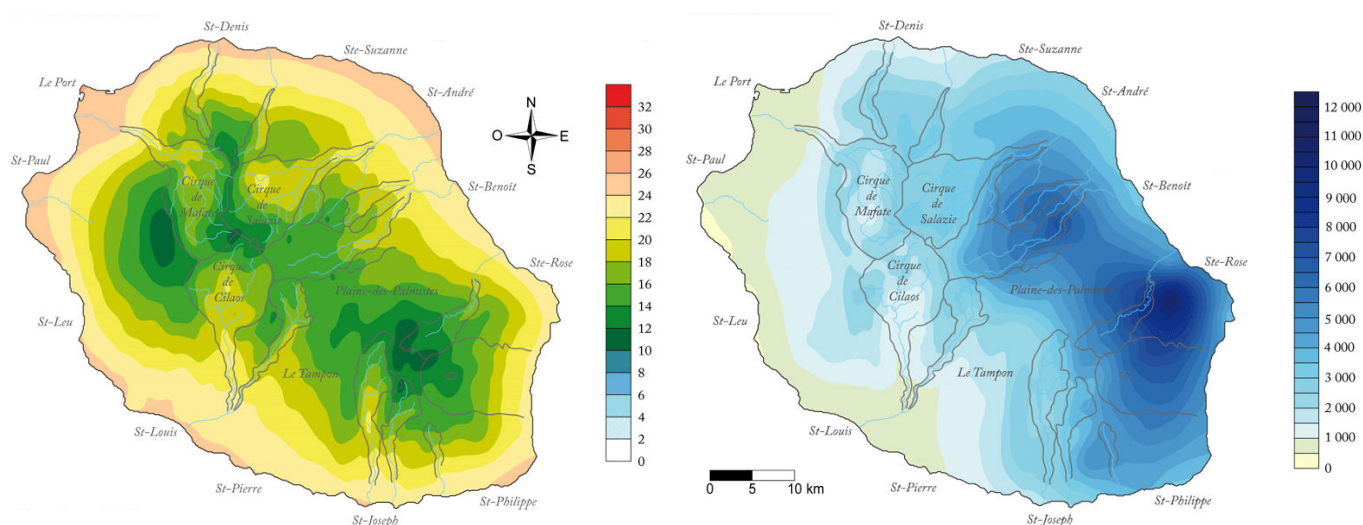


Figure 1.7. Carte des températures moyennes annuelles (à gauche ; en °C) et de la pluviométrie annuelle moyenne (à droite ; en mm) à la Réunion. Valeurs normales calculées entre 1981 et 2010. Extrait de <http://www.meteofrance.re/climat/description-du-climat>.

A Maurice, le relief est beaucoup moins marqué mais il existe néanmoins d'importantes variations pluviométriques entre le plateau central (jusqu'à 5000 mm/an) et la côté ouest (environ 1000 mm/an). En outre, la Réunion et Maurice ont subi une activité géologique intense. De nombreux épisodes volcaniques suivis

d'érosion intense et de phénomènes de subsidence ont abouti à la mise en place d'une topographie spatialement très hétérogène (Duncan 2009).

Malgré la faible superficie de ces îles, les particularités climatiques et topographiques sont à l'origine d'une mosaïque de conditions environnementales qui ont favorisé la mise en place de différentes communautés s'étant adaptées à des conditions écologiques très diverses. En combinant les données de relevés de végétation historiques et contemporains à l'extrapolation des influences climatiques et édaphiques, Vaughan & Wiehe (1937) puis Cadet (1977) ont estimé la distribution géographique originelle des principales formations végétales indigènes de Maurice et de la Réunion respectivement (Figure 1.8).

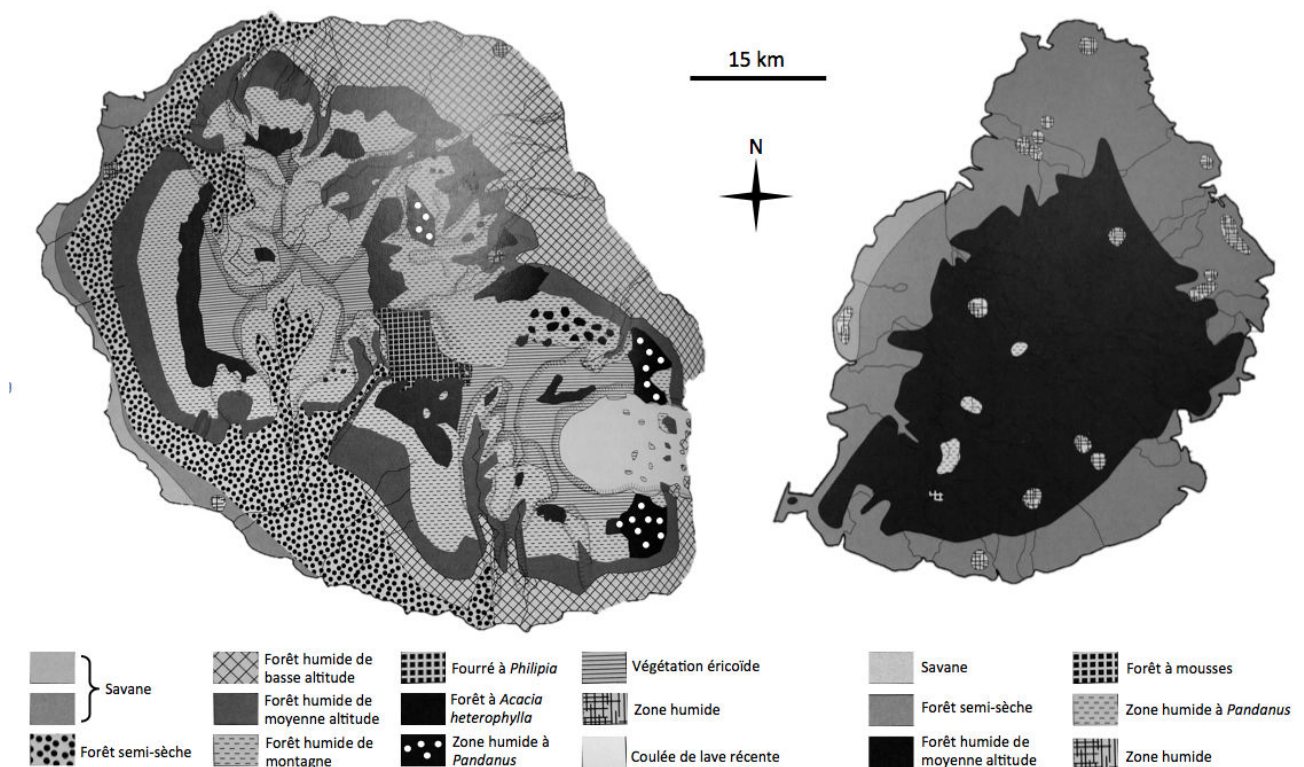


Figure 1.8. Carte phyto-géographique supposée des habitats naturels de la Réunion (à gauche) et de Maurice (à droite). La distance entre les îles n'est pas à l'échelle. Modifiée d'après Cheke & Hume (2008).

L'isolement géographique et l'hétérogénéité écologique de ces îles apparaissent donc comme des facteurs favorisant la spéciation écologique. Contrairement à d'autres archipels comme Hawaii, l'étude des processus évolutifs à l'origine de la biodiversité des Mascareignes est relativement récente. Cependant, différentes études suggèrent un rôle probable de l'adaptation à différentes niches écologiques dans la spéciation chez différents taxons.

Par exemple, une étude menée sur le zoiseau blanc *Zosterops borbonicus* révèle une structuration génétique neutre reflétant les gradients pluviométrique (est-ouest) et altitudinal (Milá *et al.* 2010). En outre la différenciation génétique selon l'altitude est concordante avec la différenciation phénotypique de traits potentiellement soumis à sélection (morphométrie et couleur du plumage). Les auteurs suggèrent que la combinaison des processus de vicariance (liée à l'activité volcanique) et de dispersion limitée par la sélection naturelle le long du gradient altitudinal sont à l'origine de la divergence entre les populations de cette espèce.

A Maurice, les geckos du genre *Phelsuma* constituent un bel exemple de radiation intra-île associée à une divergence de niche écologique. La phylogénie des espèces mascarines révèle une première divergence entre l'espèce nocturne *P. guentheri* et un clade de geckos diurnes qui a lui même radié en deux paires d'espèces sœurs *P. cepediana* et *P. rosagularis*, et *P. ornata* et *P. guimbeaui* (Austin *et al.* 2004). Les données phylogénétiques suggèrent que les grands arbres de la forêt semi-sèche représentent l'habitat ancestral des *Phelsuma* aux Mascareignes et que les spéciations de *P. cepediana* et *P. ornata* sont respectivement associées à une transition vers une végétation moins robuste à une transition vers des habitats plus secs (Austin *et al.* 2004).

Enfin chez les genres *Dombeya* et *Psiadia*, un unique événement de colonisation de la Réunion depuis Madagascar a conduit à une importante radiation intra-île de 10 et

14 lignées endémiques respectivement (Le Péchon *et al.* 2010; Strijk *et al.* 2012). Ces lignées présentent d'importantes différences phénotypiques et semblent s'être diversifiées principalement selon le gradient altitudinal et dans une moindre mesure selon le gradient pluviométrique.

Toutes ces études montrent que l'adaptation à différentes niches écologiques est associée à la divergence des populations et des espèces mais ne permettent pas de déterminer si cette divergence adaptative est à l'origine de l'isolement reproducteur. Les patrons identifiés sont donc concordants avec la spéciation écologique mais ne permettent pas de la démontrer.

1.3. Contexte de l'étude : les orchidées Angraecinae des Mascareignes

La sous-tribu des Angraecinae (tribu des Vandaeae, Orchidaceae) est représentée en Afrique de l'Est et en Amérique du Sud, mais son centre de diversification se situe dans les îles du sud-ouest de l'océan Indien (Madagascar, Comores et Mascareignes ; Micheneau *et al.* 2008). Les Angraecinae sont bien connues des naturalistes et des scientifiques à travers l'étoile de Madagascar, *Angraecum sesquipedale*. Après avoir remarqué la taille impressionnante de l'éperon de cette orchidée (environ 30 cm), Darwin a cherché à expliquer comment une pièce florale d'une telle taille a pu être formée. Selon lui, la sélection naturelle favorisait les papillons portant les trompes les plus longues par rapport à ceux à trompe plus courte car ils accèderaient à plus de nectar (Figure 1.9). Cependant, la sélection favoriserait les orchidées avec un éperon légèrement plus long que la trompe du papillon par rapport à celles à éperon plus court car elles seules seraient efficacement pollinisées suite au contact plus ferme entre le papillon et les pollinies (Figure 1.9). Cette alternance de sélection directionnelle sur la longueur de l'éperon de l'orchidée et celle de la trompe de son pollinisateur favoriserait donc la coévolution entre ces traits et permettrait

d'expliquer leur évolution 'extrême'. A l'aide de ce modèle, Darwin (1862) a prédit l'existence d'un insecte pollinisateur dont les pièces buccales devaient être suffisamment longues pour atteindre le nectar floral sécrété au fond de l'éperon d'*A. sesquipedale*. Cet insecte (*Xanthopan morgani* var. *praedicta*, Shpingidae) n'a été découvert que 40 ans plus tard, et la pollinisation de *A. sesquipedale* par ce sphinx a été démontrée plus d'un siècle après la prédiction de Darwin (Wasserthal 1997). Depuis la prédiction de Darwin, la pollinisation des orchidées angraecoïdes par les sphinx a largement été étudiée par les évolutionnistes (Nilsson *et al.* 1985, 1987, 1992; Nilsson & Rabakonandrianina 1988; Wasserthal 1997; Luyt & Johnson 2001; Martin & Johnson 2007). Cependant, la variabilité de certaines formes florales chez des espèces du genre *Angraecum* aux Mascareignes a suggéré des changements de pollinisateurs suite à la colonisation de ces îles.

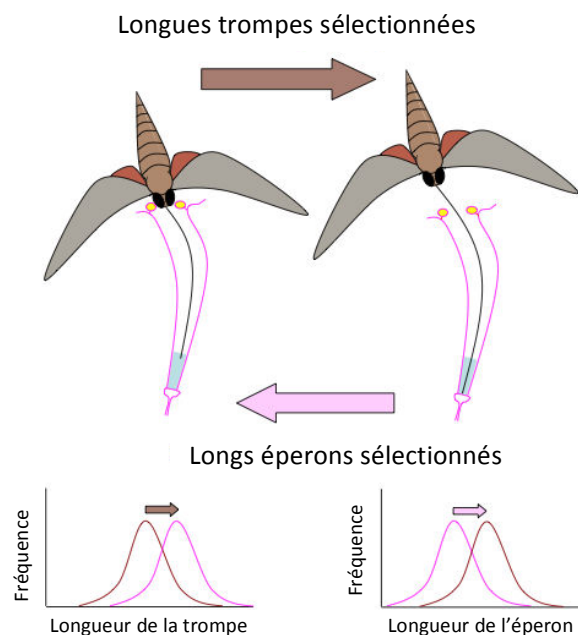


Figure 1.9. Représentation schématique du modèle de coévolution entre une orchidée nectarifère et son pollinisateur. Modifiée d'après Johnson & Anderson (2010).

1.3.1. Biogéographie des Angraecinae aux Mascareignes

A partir des données géographiques et géologiques de chaque île des Mascareignes et du statut d'endémisme des espèces, Roberts & Brummitt (2006) ont proposé un scénario sur l'origine des orchidées des Mascareignes :

- (1) Formation de l'île Maurice il y a environ 7,8 Ma et colonisation de plusieurs espèces d'orchidées depuis Madagascar suivie de radiations *in situ*.
- (2) Formation de l'île de la Réunion il y a environ 2,1 Ma et colonisation de plusieurs espèces d'orchidées depuis Maurice principalement vers les habitats de basse altitude par contrainte évolutive imposée par leur île d'origine. Colonisation d'espèces depuis Madagascar en parallèle mais dans une moindre mesure.
- (3) Différenciation des espèces à la Réunion et spéciation vers les habitats vacants de haute altitude.
- (4) Colonisation en retour de Maurice par des espèces réunionnaises peu probable due à l'absence d'habitats de haute altitude et à une flore relativement saturée en orchidées.

La confrontation de la phylogénie des Angraecinae (Micheneau *et al.* 2008a) à ce scénario permet de préciser certains points. D'après cette phylogénie, l'origine des espèces mascarines est massivement malgache et résulte de nombreux événements de colonisation, suivi de nombreuses spéciations exprimées par un fort taux d'endémisme. Cependant la majorité des spéciations sont anagénétiques et peu de radiations ont eu lieu au sein de l'archipel (Micheneau *et al.* 2008a). L'émergence de lignées spécifiquement insulaires s'est produite à deux reprises chez le genre *Jumellea*, très probablement chez les *Angraecum* à petites fleurs vertes de la section *Lemurangis* et chez les *Angraecum* de la section *Hadrangis*. En combinant les données phylogénétiques aux données écologiques, il apparaît que cette dernière radiation est associée aux interactions plante-pollinisateur (Micheneau *et al.* 2009).

1.3.2. Rôle de l'interaction plante-pollinisateur dans la radiation de la section Hadrangis

Les espèces de la section Hadrangis (*Angraecum striatum*, *A. bracteosum* et *A. cadetii*.) sont endémiques des Mascareignes et présentent des fleurs blanches avec des éperons larges et courts qui constituent des caractéristiques uniques parmi leur genre (Bossert 1987). Les observations de pollinisateurs ont montré que deux de ces espèces sont pollinisées par des oiseaux de la famille des Zosteropidae (Micheneau *et al.* 2006, 2008c) alors que la troisième espèce *A. cadetii*, est pollinisée par un criquet du genre *Glomeremus* (Micheneau *et al.* 2010). La phylogénie des Angraecinae indique que les espèces les plus apparentées à la section Hadrangis correspondent à la section Hamblotiangraecum (Madagascar, Comores) dont les fleurs ont un syndrome sphingophile (Figure 1.10). Selon l'hypothèse de colonisation depuis Madagascar, la section Hadrangis devait avoir un syndrome proche de la sphingophilie lorsqu'elle a colonisée les Mascareignes. Il y a donc eu évolution vers un syndrome de pollinisation par les orthoptères puis vers l'ornithophilie (Figure 1.10).

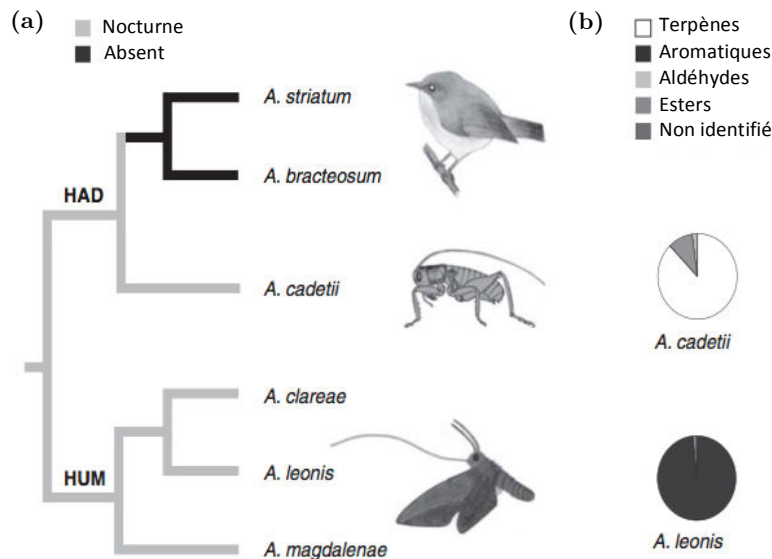


Figure 1.10. Chimie du bouquet floral des sections Hadrangis et Hamblotiangraecum par rapport à leur syndrome de pollinisation dans leur contexte phylogénétique. Modifiée d'après Micheneau *et al.* (2010).

L'adaptation à différents pollinisateurs a pu jouer un rôle important dans la mise en place de l'isolement reproducteur et donc dans la radiation de la section Hadrangis aux Mascareignes. En effet, l'interaction des traits comportementaux et morphologiques des pollinisateurs avec les traits floraux peut provoquer le transfert de pollen spécifique entre individus portant les même traits (Grant 1949). Ce transfert préférentiel de pollen entre individus présentant le même syndrome de pollinisation est appelé isolement floral et constitue une forme d'isolement reproducteur prézygotique (Schiestl & Schlüter 2009). De ce fait, l'isolement floral résultant de l'adaptation à différents pollinisateurs peut théoriquement être à l'origine de la spéciation écologique de certains taxons (van der Niet *et al.* 2014). Cela est d'autant plus probable lorsque les pollinisateurs appartiennent à différents groupes fonctionnels, comme chez les Hadrangis. Cependant, de nombreuses études ont révélé que plusieurs formes d'isolement reproducteur agissent en synergie avec l'isolement floral pour maintenir la divergence entre des espèces sœurs (revues dans Kay & Sargent 2009). Chez les Hadrangis, les trois espèces semblent se distinguer par leur distribution altitudinale ce qui pourrait refléter une adaptation à différents types d'habitats (Micheneau *et al.* 2006, 2008c, 2010). Il serait donc possible que l'isolement floral agisse en synergie avec l'isolement écogéographique. Cependant, pour identifier le facteur écologique (sélection liée à l'altitude ou aux pollinisateurs), il faudrait déterminer quel type d'isolement reproducteur a précédé l'autre durant le continuum de spéciation.

1.3.3. Le genre *Jumellea*

Le genre *Jumellea* représente le deuxième genre d'orchidée angraecoïdes le plus diversifié aux Mascareignes (neuf espèces, dont cinq endémiques) après *Angraecum* (30 espèces). Les neuf espèces de *Jumellea* de l'archipel se distinguent, entre autres, par la longueur de l'éperon. Cinq espèces possèdent un éperon supérieur à 80 mm de long ; les quatre autres présentent un éperon de moins de 50 mm de long. Alors que

toutes les espèces à long éperon semblent être issues d'évènements de colonisation distincts, les espèces à court éperon proviendraient de deux évènements de colonisation dont au moins un a été suivi d'une radiation (Figure 1.11 ; Micheneau *et al.* 2008a ; Rakotoarivelo *et al.* 2012).

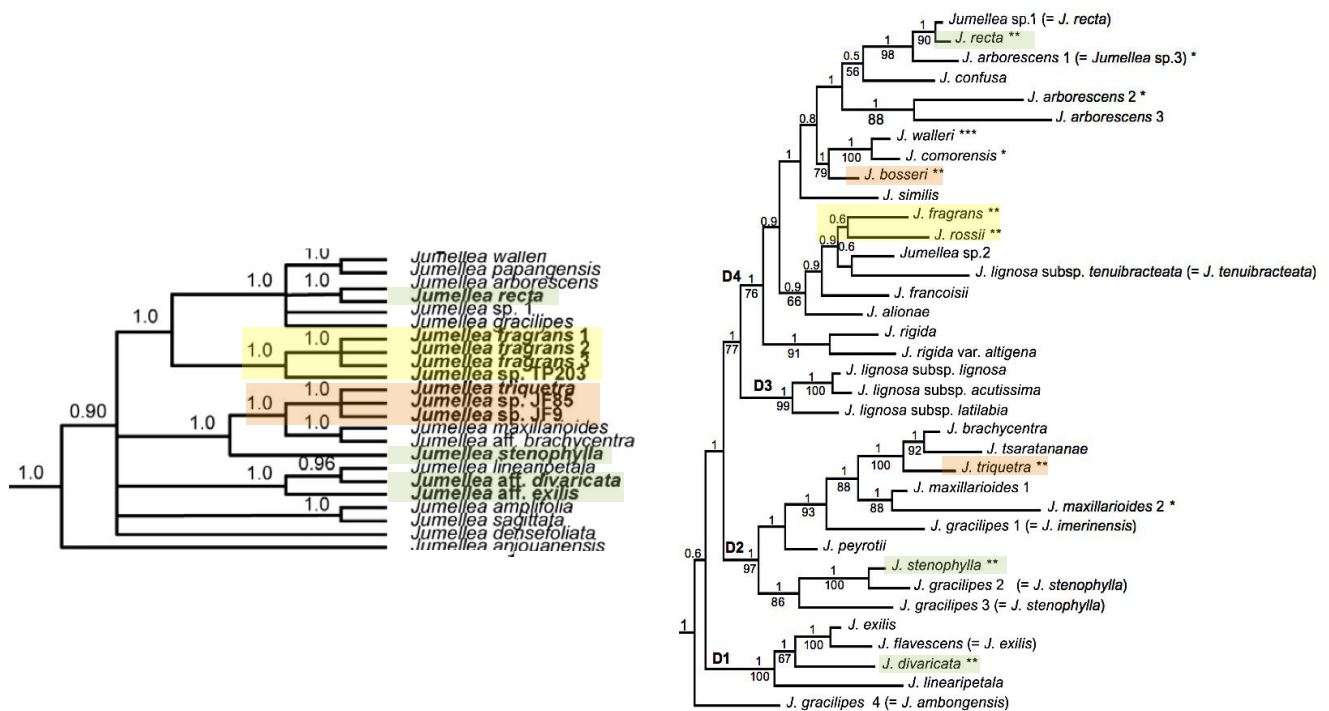


Figure 1.11. Extraits des arbres phylogénétiques des orchidées angraecoïdes (à gauche ; d'après Micheneau *et al.* 2008a) et du genre *Jumellea* (à droite ; d'après Rakotoarivelo *et al.* 2012) obtenus par consensus majoritaire après analyse bayésienne de la matrice combinée des séquences *matK*, *trnL-F*, *rps16* (à gauche) et *matK*, *trnL-F*, *rps16*, *ycf1*, nrITS (à droite). Les probabilités postérieures et les valeurs de bootstrap sont respectivement indiquées au-dessus et en-dessous des branches. En vert, les espèces à long éperon ; en jaune et orange, les clades ayant probablement radié aux Mascareignes. À gauche ; *J. fragrans* = *J. rossii* ; *Jumellea* sp. TP203 = *J. fragrans* ; *Jumellea* sp. JF85 = *J. triquetra* ; et *Jumellea* sp. JF9 = *J. bosseri*. À droite ; *, spécimens collectés aux Comores ; **, spécimens collectés aux Mascareignes ; ***, spécimens collectés en Afrique tout le reste étant collecté à Madagascar.

Par ailleurs bien qu'elles aient conservé un syndrome de pollinisation typiquement sphingophile (présence de nectar et d'un bouquet floral typique), les espèces à long éperon ont évolué vers l'autofertilité suite à la colonisation des Mascareignes où la relation plante-pollinisateur semble inexistante probablement à cause de l'absence de

pollinisateurs adéquats lors de la colonisation (Micheneau *et al.* 2008b). A l'inverse, les espèces à court éperon ont conservé leur relation avec les pollinisateurs et se sont diversifiées au sein de l'archipel. Contrairement à la section Hadrangis, ces espèces de *Jumellea* endémiques des Mascareignes ne semblent pas très différentes morphologiquement des espèces malgaches apparentées.

Parmi les deux clades endémiques de *Jumellea* s'étant diversifié aux Mascareignes, celui formé par les espèces sœurs *J. rossii* et *J. fragrans* apparaît idéal pour l'étude des facteurs écologiques à l'origine de la divergence et de la mise en place de l'isolement reproducteur. D'une part la divergence au sein de ce clade semble être en cours ou très récente comme l'illustre le nœud basal faiblement soutenu dans la phylogénie (Rakotoarivelo *et al.* 2012). D'autre part, *J. rossii* présente une large répartition géographique et se retrouve dans différents types d'habitats. Cela permet d'étudier l'influence relative des facteurs écologiques (habitat et pollinisateur) dans la divergence aux échelles inter et intraspécifique afin de dégager leur importance dans la progression du continuum de spéciation dans ce clade.

Enfin, le faham est une orchidée d'intérêt patrimonial à la Réunion, utilisée pour ses propriétés aromatiques et médicinales. Actuellement, elle est largement prélevée en milieu naturel et ne bénéficie d'aucun statut de protection en partie à cause d'une taxinomie incertaine.

1.4. Problématique, objectifs et structure de la thèse

Bien que l'origine du concept de spéciation écologique remonte aux débuts de la pensée évolutionniste, c'est seulement depuis deux décennies que l'idée a réellement émergée à la faveur d'une reclassification des modes de spéciation selon des critères géographiques vers des critères centrés sur les mécanismes à l'origine de l'isolement reproducteur. Selon ce mode de spéciation, l'isolement reproducteur résulte de la

sélection divergente et de l'adaptation locale à différentes niches écologiques. L'un des points forts de cette théorie réside dans le fait qu'elle permet de décrire une grande diversité de situations possibles car plusieurs facteurs peuvent être à l'origine de la sélection divergente et peuvent provoquer de nombreux types d'isolement reproducteurs. En outre, en considérant la nature continue du processus de formation des espèces, la spéciation écologique peut être étudiée pendant la progression de la divergence. De nombreuses études théoriques et empiriques ont apporté des éléments très probants sur la spéciation écologique et son importance dans la nature. Les îles océaniques, reconnues comme de véritables laboratoires naturels pour l'étude de l'évolution, constituent des systèmes particulièrement adaptés à l'étude de la spéciation écologique notamment parce que ces systèmes peuvent être le siège de radiations adaptatives dans lesquelles la sélection naturelle divergente joue un rôle important. Cependant, les cas de radiations en milieu insulaire sont encore peu étudiés dans ce cadre conceptuel ; particulièrement les facteurs à l'origine de la sélection divergente et leur lien avec l'isolement reproducteur. Aux Mascareignes, le rôle probable de la spéciation écologique dans la diversification des taxons est suggéré par des phylogénies mettant en évidence des cas de radiations adaptatives et des approches populationnelles révélant des cas de différenciation intraspécifique le long des gradients environnementaux. Chez les orchidées, l'interaction plante-pollinisateur semble avoir joué un rôle important dans la radiation de la section endémique des *Hadrangis*. Cependant, les espèces étant déjà différenciées, il est difficile de savoir si le changement de pollinisateur est à l'origine de la spéciation. Pour déterminer les facteurs à l'origine de la divergence, il apparaît nécessaire d'étudier un clade en cours de diversification.

L'objectif général de cette thèse est d'étudier les rôles respectifs des variations phénotypiques liées à la pollinisation et de l'habitat dans l'évolution de l'isolement reproducteur chez le faham, un clade en cours de diversification. Dans le cadre

conceptuel de la spéciation écologique, il s'agit d'une part d'identifier les facteurs à l'origine de la sélection divergente avec un *a priori* sur les pollinisateurs et les habitats et d'autre part d'estimer l'influence de ces facteurs sur l'isolement reproducteur.

Le chapitre 2 permet de présenter le modèle biologique étudié et de clarifier son statut taxinomique. Dans le chapitre 3, il s'agit de déterminer les patrons de variation morphologique et génétique du faham de manière la plus exhaustive possible à l'échelle de son aire totale de distribution. Cette partie permet d'identifier les unités évolutives et de fournir des recommandations en terme de conservation. Les chapitres 4 et 5 traitent directement de la spéciation écologique à deux niveaux différents du continuum de spéciation. Le chapitre 4 étudie la divergence de traits adaptatifs liés à la pollinisation (traits 'magiques') entre *Jumellea rossii* et *J. fragrans* et leur rôle joué dans l'isolement reproducteur à la Réunion. Le chapitre 5 étudie les rôles relatifs de l'habitat et de la géographie dans la structure génétique et morphologique des populations de *J. rossii* (approche par flux de gène). A partir de ces résultats, le rôle des habitats et des pollinisateurs dans la diversification du faham aux Mascareignes et la possibilité de spéciation écologique sont discutés dans le chapitre 6.

2

Différences morphologiques et identification de *Jumellea rossii* et *Jumellea fragrans* (Orchidaceae) à l'île de la Réunion : implications pour la conservation

Bertrand Mallet¹, Thierry Pailler¹, Laury Blambert¹, Fanny Rakotoarivelo¹, Claudia Baider² & Laurence Humeau¹.

¹*UMR Peuplements Végétaux et Bio-agresseurs en Milieu Tropical, Université de la Réunion, Ile de La Réunion, France.*

²*The Mauritius Herbarium, R. E. Vaughan Building, MSIRI, Reduit, Mauritius.*

Publié dans *La Terre et la Vie – Revue d'Écologie* 67: 73-83, 2012.

2.1. Présentation de l'article

2.1.1. Résumé

La clarification du statut taxonomique des espèces constitue un préambule nécessaire à la mise en place de mesures de conservation appropriées et efficaces, particulièrement sur les îles océaniques où la radiation adaptative rend difficile la reconnaissance des entités biologiques fonctionnelles. C'est le cas de certaines orchidées de La Réunion comme le faham (*Jumellea sp.*) qui regroupe plusieurs taxons dont les populations se situent à différentes altitudes et semble présenter des variations morphologiques et reproductives. Dans cette étude, nous proposons d'éclaircir la position systématique des taxons composant le complexe d'espèces regroupées sous le nom de faham par le biais d'une approche morphométrique à l'échelle populationnelle et d'identifier des caractères morphologiques permettant de distinguer les différents taxons. Quatorze caractères (végétatifs et floraux) ont été mesurés sur 51 individus issus de trois populations naturelles représentatives de la distribution altitudinale du complexe. Des analyses multivariées effectuées sur ces caractères ont montré une séparation des individus en deux groupes (Mare-Longue d'une part, Basse-Vallée et Cilaos d'autre part). Neuf caractères sont significativement différents entre la population de Mare-Longue et les populations de Basse-Vallée et Cilaos et permettent de distinguer les deux groupes. La population de Mare-Longue appartiendrait à l'espèce *Jumellea fragrans* (Thouars) Schltr. et les populations de Basse-Vallée et Cilaos à l'espèce *Jumellea rossii* Senghas. En termes de conservation, la première recommandation est de reconnaître deux espèces bien distinctes : *J. rossii* et *J. fragrans*. D'autre part, l'inscription dans la catégorie « vulnérable » de la Liste Rouge de l'UICN et l'adoption d'un statut de protection semblent fortement recommandées pour *J. fragrans*. Concernant *J. rossii*, des connaissances approfondies sur la distribution géographique et la dynamique des populations de l'espèce s'avèrent nécessaires afin d'évaluer le risque d'extinction.

Parallèlement, l'étude de la diversité génétique des deux espèces fournirait des données utiles pour la mise en œuvre de plans de conservation.

2.1.2. Abstract

Conservation strategies are not possible when there is confusion in the taxonomic status of a group of plants. Such confusion makes difficult for systematic biologists to identify functional biological entities. This is particularly true in the case of species that diversified fast due to adaptive radiation particularly plants from the oceanic islands. It is the case of certain orchids from Réunion. Among them, the faham complex includes several taxa whose populations are situated at various elevations with morphological and reproductive variations. These taxa are actually merged into one name: *Jumellea fragrans* causing confusion in their taxonomic status. This confusion has caused numerous problems of identification and errors hindering the protection status of the species. In this study, we suggest to clarify the systematic position of the taxa composing complex *Jumellea fragrans* using a biometric approach at population scale. The objective is to identify morphological characters that allow distinguishing the taxa of the *J. fragrans* complex. Morphological characters (vegetative and floral) are measured on individuals from three natural populations representative of altitudinal range of the complex. Principal component analysis made on the characters show a separation of the individuals in two groups (Mare-Longue vs Basse-Vallée and Cilaos). Nine characters (on 14 measured) are significantly different between Mare-Longue population and the populations of Basse-Vallée and Cilaos and allow identifying both groups. Population of Mare-Longue belongs to the species *Jumellea fragrans* (Thouars) Schltr. and populations of Basse-Vallée and Cilaos belongs to the species *Jumellea rossii* Senghas. In terms of conservation, the first recommendation is to recognize two different species: *J. rossii* and *J. fragrans*. Moreover, putting *J. fragrans* in to the "vulnerable" IUCN Red List category and the

adoption of a protection status are recommended. Concerning *J. rossii*, more studies on geographical range and population dynamics are necessary to estimate the risk of extinction. In the same way, studies on genetic variability of both species would generate useful data for implementation of conservation strategies.

2.2. Introduction

Toute action de conservation repose en grande partie sur la connaissance taxonomique des espèces, de leur biologie et de leur distribution (Dubois 2003). Le découpage des taxons en espèces est donc lourd de conséquences sur les stratégies mises en œuvre pour protéger la biodiversité. La clarification des statuts taxonomiques est donc être un préambule nécessaire à la mise en place de mesures de conservation appropriées et efficaces. Ceci semble d'autant plus vrai que, selon (Dubois 2003), de nombreuses dénominations d'espèces n'ayant pas fait l'objet d'une révision taxonomique récente s'avèrent injustifiées soit parce qu'elles sont synonymes d'autres espèces soit parce qu'elles regroupent en réalité plusieurs espèces qui doivent être classées en tant que telles. Les confusions taxonomiques concernent particulièrement les îles océaniques où les lignées connaissent une diversification rapide (Whittaker 1998), de telle sorte qu'il est souvent difficile pour un systématicien de reconnaître des entités biologiques fonctionnelles. En effet, lors de la colonisation d'une île océanique, la diversité du milieu peut favoriser, chez les espèces colonisatrices, de nouvelles adaptations et une différenciation en plusieurs espèces se distinguant par les différentes niches écologiques utilisées. Ce phénomène est communément appelé radiation adaptative (Carlquist 1974; Whittaker 1998) et conduit à une diversification rapide des espèces. Aussi, une approche populationnelle à l'échelle des complexes d'espèces en phase de radiation est souvent nécessaire pour clarifier la position systématique des taxons.

Les orchidées sont reconnues depuis longtemps comme étant d'excellents modèles d'études en écologie et particulièrement en écologie évolutive (Darwin 1862; van der Pilj & Dodson 1966). La radiation adaptative des orchidées, initiée il y a 80 millions d'années (Ramírez *et al.* 2007), a conduit à l'apparition d'environ 20 000 espèces (Dressler 1981; Arditti 1992). Elle résulte en partie de la grande capacité de ces plantes à s'adapter à la formidable diversité des insectes présents à la surface du globe (Dressler 1993; van der Cingel 2001) et susceptibles de les polliniser. Dans le sud-ouest de l'océan Indien, les orchidées sont représentées par plus de 1000 espèces réparties dans plus de cinquante genres (de Cordemoy; Cadet 1979). A La Réunion, île océanique tropicale de l'océan indien, cette famille occupe tous les milieux naturels de 0 à 2800 mètres d'altitude et chaque écosystème renferme entre vingt et quarante espèces d'orchidées (Cadet 1977; Jacquemyn *et al.* 2005) soit environ 20% de la diversité spécifique des angiospermes de l'île. Par ailleurs, les orchidées n'ont pas les mêmes modes de reproduction selon l'altitude (Jacquemyn *et al.* 2005). De ce fait, cette famille constitue un bon indicateur de la diversité spécifique et fonctionnelle au sein des écosystèmes de La Réunion. En outre, sept des huit espèces de monocotylédones aujourd'hui menacées et protégées à La Réunion sont des orchidées et la plupart des espèces subissent une forte pression de la part des collectionneurs et des tisaneurs. En effet, certaines espèces possèdent un intérêt ornemental alors que d'autres sont largement utilisées dans la tisanerie locale (Cadet 1979; Lavergne 1990). Parmi les orchidées réunionnaises, le faham regroupe plusieurs taxons situés à différentes altitudes et semblant présenter des variations morphologiques et reproductives. Ces différents taxons sont actuellement regroupés sous le nom de *Jumellea fragrans*, ce qui a donné lieu à de nombreux problèmes d'identification qui aujourd'hui engendrent des erreurs au niveau du statut de protection des espèces. Le faham est connu des réunionnais pour ses qualités thérapeutiques et aromatiques (de Cordemoy; Lavergne 1990; Shum Cheong Sing *et al.* 1992). Il fait l'objet d'importants prélèvements en populations naturelles pour ses feuilles, vendues principalement sur

les marchés de l'île, le plus souvent auprès des tisaneurs (Lavergne 1990) mais aussi dans la grande distribution en mélange avec d'autres épices pour la préparation de rhum arrangé.

Dans cet article, nous proposons d'éclaircir la position systématique des différents taxons composant le complexe *Jumellea fragrans* par le biais d'une approche morphométrique à l'échelle populationnelle. L'objectif est donc d'identifier les caractères morphologiques permettant de distinguer les différents taxons du complexe d'espèces *J. fragrans* sur la base de mesures morphologiques effectuées dans des populations représentatives de sa distribution géographique. Ces caractères devraient pouvoir constituer des critères d'identification taxonomique des espèces par un examen rapide sur le terrain.

2.3. Matériels et méthodes

2.3.1. Sites d'étude

La Réunion (55°30'E, 21°00'S) est située à 700 km de la côte Est de Madagascar. L'île, d'origine volcanique récente (âgée d'environ 2,8 millions d'années), possède une surface émergée de 2500 km² et culmine à 3070m d'altitude (Piton des Neiges). Du fait de ce gradient altitudinal et de l'existence d'un gradient climatique entre l'Est et l'Ouest de l'île, La Réunion présente une importante diversité d'habitats naturels dont la plupart sont cependant menacés. En effet, sur les 19 principaux types d'habitats naturels définis par Strasberg *et al.* (2005), certains ont subi d'importantes transformations comme par exemple les forêts de basse altitude (jusqu'à 500m) dont la quasi-totalité a été convertie en terres agricoles ou zones urbanisées. Par ailleurs, les invasions par les espèces introduites (végétales ou animales) constituent une menace supplémentaire pour les habitats indigènes qui ne couvrent plus que 30% de leur surface originelle (Strasberg *et al.* 2005).

2.3.2. Matériel biologique

Les espèces du genre *Jumellea* Schltr. sont des orchidées épiphytes faisant partie de la sous-tribu des Angraecinae. Elles possèdent des fleurs blanches nectarifères, très odorantes à la tombée de la nuit. A La Réunion, le genre *Jumellea* est représenté par neuf espèces (six sont endémiques), dont le faham. Il s'agit d'une orchidée épiphyte, a priori allogame (non autofertile) ce qui implique une forte dépendance aux pollinisateurs (données non publiées). Elle présente un syndrome de pollinisation sphingophile caractérisé par une émission d'odeur au crépuscule, des fleurs blanches et un éperon fin et nectarifère. Elle possède également des bractées vert pâle et des feuilles caractérisées par un apex profondément échancré voire bilobé (Figure 2.1). Ses populations sont réparties sur toute l'île (Figure 2.2), dans différents milieux allant de 200 à 1920 mètres d'altitude (Jacquemyn *et al.* 2005). Selon sa localisation, cette espèce fleurit entre décembre et avril. Le faham se retrouve à l'Ile Maurice où il y a quasiment disparu (Roberts 2001).

Cette étude morphométrique a été menée durant la saison de floraison du faham (décembre 2007 à février 2008) sur trois populations naturelles réparties le long du gradient altitudinal : forêt humide de basse altitude vers 250 m à Mare-Longue (ML), forêt de moyenne altitude humide de la côte au vent vers 800 m à Basse-Vallée (BV) et forêt de montagne humide de la côte sous le vent vers 1450 m à Cilaos (CL, Figure 2.2).

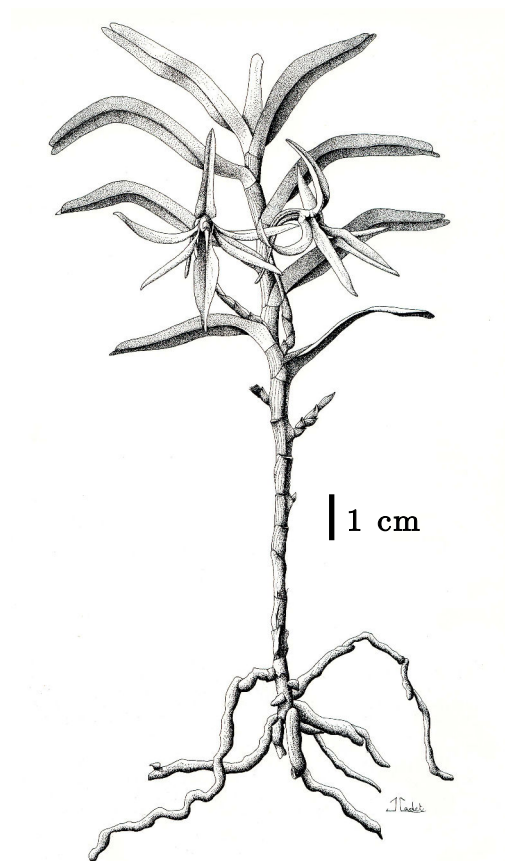


Figure 2.1. Dessin d'un individu fleuri de faham (*Jumellea rossii*, dessin : J. Cadet).

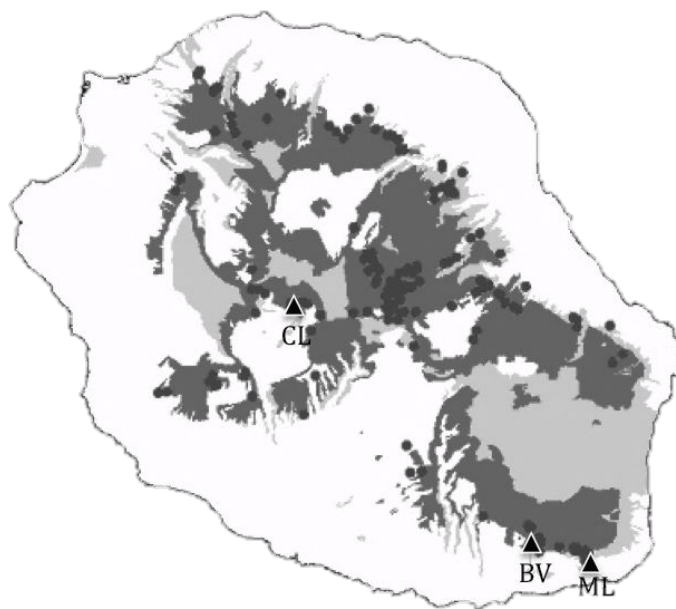


Figure 2.2. Carte de distribution des populations de faham à La Réunion. Points : populations répertoriées ; Triangles : populations échantillonnées (CL : Cilaos, BV : Basse-Vallée, ML : Mare-Longue) ; Gris clair : zone de végétation préservée ; Gris foncé : distribution probable du faham correspondant aux types d'habitats dans lesquels les espèces ont été observées.

2.3.3. Mesures végétatives et florales

Dans chaque population, au moins 14 individus portant chacun trois tiges au minimum ont été échantillonnés. Sur chaque individu, une tige portant au moins deux fleurs a été prélevée à l'aide d'un sécateur ou d'un ébrancheur pour les plantes situées dans la canopée. Pour examiner les caractères végétatifs, la longueur (L), la largeur (l) ainsi que la longueur de l'entre-nœud (E) ont été mesurées pour les 5 feuilles les plus âgées (situées à la base de la tige) de chaque individu dans chaque population. Toutes les mesures ont été faites à l'aide d'un pied à coulisse électronique (Fisher scientific, précision : 0,01 mm).

Pour examiner les caractères reproducteurs, sur au moins deux fleurs de chaque individu, le nectar a été extrait de l'éperon à l'aide de microtubes de 5 μ L et le volume de nectar (NEC) a été immédiatement mesuré en déterminant la hauteur atteinte dans le microtube. La longueur de l'éperon (EPR) a également été quantifiée. Les fleurs ont été ensuite conservées dans des piluliers contenant de l'alcool à 70°. Neuf caractères floraux ont pu ensuite être mesurés selon la méthode retenue par Micheneau *et al.* (2006). Certains critères ont été rajoutés ou adaptés pour mieux rendre compte de la morphologie des fleurs de notre étude. Ainsi, la hauteur de la colonne (HC), la longueur (LL) et la largeur (lL) du labelle, la longueur (LP) et la largeur (lP) du pétale, la longueur (LSL) et la largeur (lSL) du sépale latéral et la longueur (LSD) et la largeur (lSD) du sépale dorsal ont été mesurées (Figure 2.3).

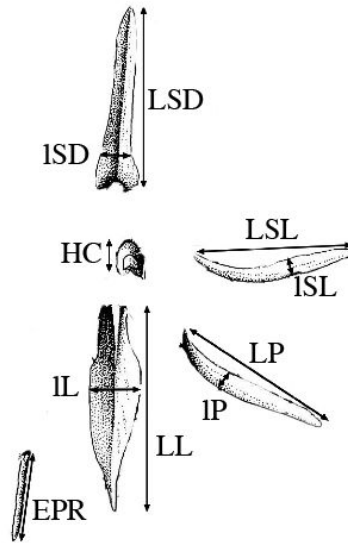


Figure 2.3. Illustration des caractères morphologiques floraux mesurés sur les individus de faham. Longueur de l'éperon (EPR), hauteur de la colonne (HC), longueur du labelle (LL), largeur du labelle (IL), longueur du pétale (LP), largeur du pétale (IP), longueur du sépale latéral (LSL), largeur du sépale latéral (ISL), longueur du sépale dorsal (LSD), largeur du sépale dorsal (ISD).

Les différences entre les individus échantillonnés pour les caractères mesurés ont d'abord été évaluées par deux Analyses en Composantes Principales (ACP) : l'une portant sur les caractères végétatifs, l'autre sur les caractères reproducteurs. Au vu des résultats des tests statistiques de Bartlett et de Shapiro révélant respectivement l'hétéroscédasticité (non homogénéité des variances) et la non normalité des distributions des données, des analyses de variance non paramétriques ont été effectuées. Pour chaque caractère mesuré, les populations ont été ainsi comparées par une analyse de variance de Kruskal-Wallis puis l'égalité des moyennes entre les populations deux à deux a été testée grâce à un test de Wilcoxon ajusté par la méthode de Bonferroni. Toutes les analyses ont été effectuées à l'aide du logiciel R version 2.13.0 (Team 2011) et les ACP à l'aide du package ade4 implémenté dans R (Dray & Dufour 2007).

2.4. Résultats

2.4.1. Phénologie florale

Pour la saison 2007-2008, les périodes de floraison des trois populations de *Jumellea* sont disjointes. En effet, la population CL a fleuri du 15 décembre au 28 janvier, la population BV a fleuri du 12 au 25 mars et la population ML a fleuri du 27 mars au 10 avril. D'autre part, la période de floraison de la population à BV est plus proche de celle de ML (2 jours de décalage) que de celle de CL (plus d'un mois de décalage). De la même manière, la durée de floraison à BV (12 jours) est plus proche de celle de ML (14 jours) que de celle de CL (44 jours). Cependant les dates de floraison de ces populations peuvent varier de plusieurs semaines d'une année à l'autre (observations personnelles).

2.4.2. Mesures des caractères végétatifs et reproducteurs

Les analyses multivariées effectuées d'une part sur les caractères végétatifs (Figure 2.4A) et d'autre part sur les caractères reproducteurs (Figure 2.4B) montrent, dans les deux cas, deux groupes bien distincts. Les individus de BV et de CL forment un premier groupe clairement dissemblable du groupe constitué par les individus de ML. Cette séparation est, pour les caractères végétatifs et reproducteurs, principalement due à l'axe 1 qui exprime respectivement 87,2 % et 48,9 % de la variance totale, l'axe 2 exprimant respectivement 7,9 % et 21,3 % de la variance totale. Pour les caractères végétatifs, les trois variables sont négativement corrélées à l'axe 1 et y contribuent de manière égale. Pour les caractères reproducteurs, 6 variables (LSD, EPR, LSL, LP, LSL et IL) sont négativement corrélées à l'axe 1 ($r > 0,75$).

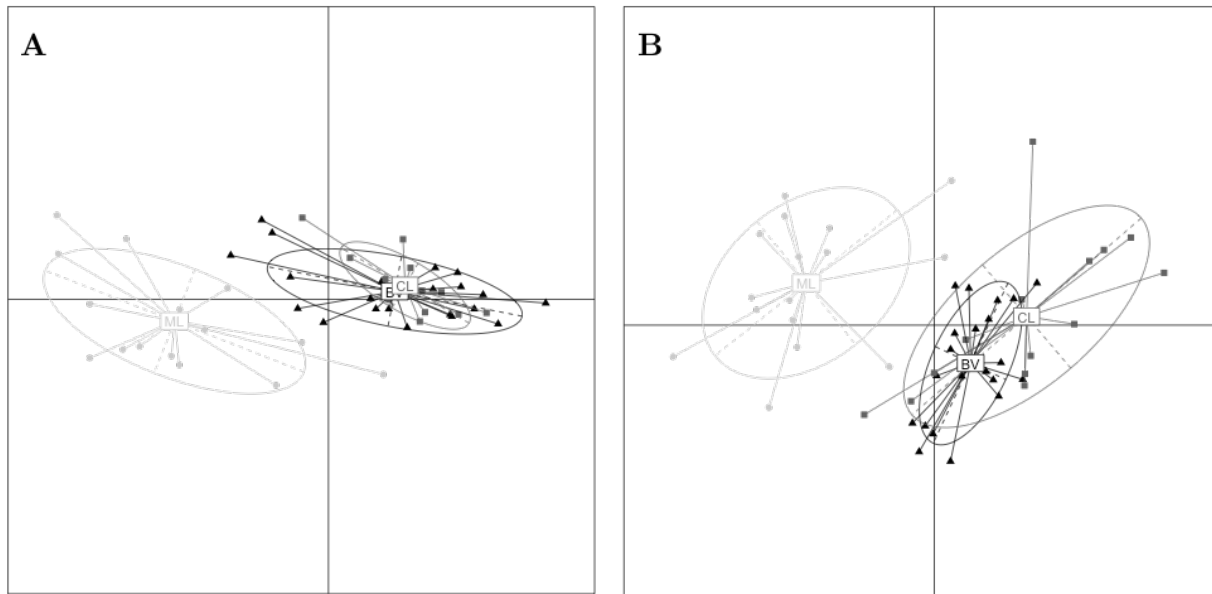


Figure 2.4. Résultats de l'Analyse en Composantes Principales dans le plan formé par les axes 1-2 et réalisée sur les données morphologiques (A) végétatives et (B) florales de trois populations naturelles de faham. Les carrés représentent les individus de Cilaos (CL), les triangles ceux de Basse-Vallée (BV) et les ronds ceux de Mare-Longue (ML). Les étiquettes portant les noms des populations correspondent au barycentre du nuage de point formé par les individus de chaque population. Les ellipses quantifient la dispersion des individus d'une population, la longueur des axes égale 1,5 fois l'écart-type des coordonnées des projections sur les axes.

Pour tous les caractères mesurés, les moyennes et écart-types ainsi que les résultats de l'analyse de variance et des tests de comparaison de moyennes sont présentés dans le Tableau 2.1. Les individus de ML se caractérisent par des feuilles de grandes dimensions avec d'importants entre-nœuds s'opposant ainsi aux individus de CL et BV (caractérisés par des feuilles de petites dimensions avec des entre-nœuds courts). Dans une moindre mesure, ces deux groupes de populations se distinguent par certains caractères floraux (LSD, EPR, LSL, LP, lSL et lL) qui ont des valeurs plus élevées à ML qu'à BV et CL.

Tableau 2.1. Moyennes et écart-types (entre parenthèses) des caractères morphologiques utilisés pour l'analyse morphométrique des trois populations de faham échantillonnées (n = nombre d'individus). * : $0,01 < P < 0,05$. ** : $0,001 < P < 0,01$. *** : $P < 0,001$. ns : non significatif. Différentes lettres en exposant sur une même ligne indiquent une différence significative ($p < 0,05$) des moyennes selon le test de Wilcoxon ajusté par la méthode de Bonferroni.

	Cilaos (n=14)	Basse- Vallée (n=21)	Mare- Longue (n=16)	P-value Kruskal -Wallis
Longueur de feuille (mm)	56,8 ^a	61,4 ^a	108,6 ^b	***
Largeur de feuille (mm)	12,0 ^a	12,1 ^a	15,8 ^b	***
Longueur de l'entre-nœud (mm)	10,6 ^a	10,7 ^a	14,9 ^b	**
Longueur de l'éperon (mm)	20,0 ^a	16,7 ^b	38,5 ^c	***
Quantité de nectar (μL)	0,5 ^a	0,4 ^a	3,6 ^b	***
Hauteur de la colonne (mm)	2,3 ^a	2,2 ^{a,b}	2,5 ^b	**
Longueur du labelle (mm)	22,4	24,1	23,7	ns
Largeur du labelle (mm)	6,8 ^a	7,6 ^b	9,5 ^c	***
Longueur du pétale (mm)	21,4 ^a	22,5 ^a	24,2 ^b	***
Largeur du pétale (mm)	3,2 ^a	3,4 ^b	3,7 ^c	***
Longueur du sépale latéral (mm)	22,4 ^{a,b}	23,9 ^a	25,2 ^b	**
Largeur du sépale latéral (mm)	3,9 ^a	4,0 ^a	4,7 ^b	***
Longueur du sépale dorsal (mm)	21,2 ^{a,b}	22,3 ^a	23,3 ^b	*
Largeur du sépale dorsal (mm)	4,2	4,2	4,3	ns

2.5. Discussion

2.5.1. Différences taxonomiques au sein du complexe du faham

Cette étude a permis de mettre en évidence des variations au sein du complexe *Jumellea fragrans* tant au niveau phénologique que morphologique. La variabilité phénologique observée semble liée à l'altitude et ne reflète pas la variabilité

morphologique. En effet, les résultats obtenus pour certains caractères morphologiques (L, l, E, LSD, EPR, LSL, LP, lSL et lL) isolent la population ML qui héberge une forme de faham globalement plus grande par rapport aux populations de CL et BV. Le morphe de ML présente donc une série de caractéristiques particulières qui exprime sa singularité parmi tous les individus étudiés dans les trois populations: feuilles de taille plus importante, éperon deux fois plus grand et une production de nectar beaucoup plus importante.

Cette distinction morphologique entre la population de ML et celles de CL et BV se retrouve également au niveau génétique. Des résultats obtenus sur l'ADN extranucléaire (marqueurs *matK*, *rps16* et *trnL-F*) indiquent que ces taxons sont phylogénétiquement différenciés et apparaissent comme espèces sœurs (Micheneau *et al.* 2008a; Rakotoarivelo *et al.* 2012) suggérant une divergence suite à la colonisation de La Réunion par un ancêtre d'origine malgache. Les résultats sur la phénologie florale indiquent un très léger décalage temporel entre la population de ML et la population de BV ; il semble donc peu probable que ce décalage soit à l'origine de l'isolement reproducteur. Néanmoins, un suivi de la phénologie de ces populations sur plusieurs années est nécessaire pour pouvoir conclure. D'autre part, une étude de l'écologie de la pollinisation de ces deux espèces permettrait d'identifier le (les) pollinisateur(s). Les différences florales, notamment concernant la longueur de l'éperon, observées entre les populations d'altitude (BV et CL) et ML peuvent en effet être liées à des pollinisateurs distincts qui provoqueraient un isolement reproducteur entre les deux groupes. Enfin, une étude de génétique des populations permettrait non seulement de comparer la variabilité génétique à la variabilité morphologique mise en évidence dans cette étude mais aussi d'estimer les flux de gènes entre les populations de chacune des deux espèces et de repérer d'éventuels hybrides.

2.5.2. Origine de la confusion taxonomique et identification des taxons

Historiquement, *Jumellea fragrans* (Thouars) Schlechter est une espèce décrite par le botaniste français Du Petit-Thouars (1822) sous le nom d'*Angraecum fragrans* à partir d'une plante récoltée à l'île Bourbon. Dans son ouvrage de 1822, Du Petit-Thouars publie une illustration de l'*Angraecum fragrans* (Figure 2.5). Aujourd'hui, aucun échantillon d'herbier constituant le type de cette espèce n'est connu. L'illustration d'*Angraecum fragrans* peut donc constituer le lectotype pour cette espèce. Le choix de ce lectotype réside dans le fait qu'*Angraecum fragrans* a été décrit pour la première fois par Du Petit-Thouars et que ce dessin est une illustration faite par le même premier auteur de cette espèce. En 1915, Schlechter crée un nouveau genre (*Jumellea* Schltr.) au sein duquel il transfère *Angraecum fragrans* Thouars qui devient ainsi synonyme de *Jumellea fragrans* (Thouars) Schlechter et l'illustration d'*Angraecum fragrans* Thou. évoquée plus haut devient le type pour l'espèce *Jumellea fragrans* (Thouars) Schlechter.

Les mesures morphologiques permettent d'identifier le statut taxonomique des deux groupes d'individus observés dans cette étude. En effet, les individus de ML présentent un éperon deux fois plus long que le labelle, alors que l'éperon est de la même taille que le labelle chez les individus de BV et CL. Sur le dessin de l'espèce *Angraecum fragrans* (Figure 2.5) fait par Thouars en 1822, la longueur de l'éperon mesure exactement le double de celle du labelle de la fleur représentée. Ce caractère permet de définir la population de ML comme appartenant à l'espèce *Jumellea fragrans* (Thouars) Schltr. (synonyme : *Angraecum fragrans* Thouars).

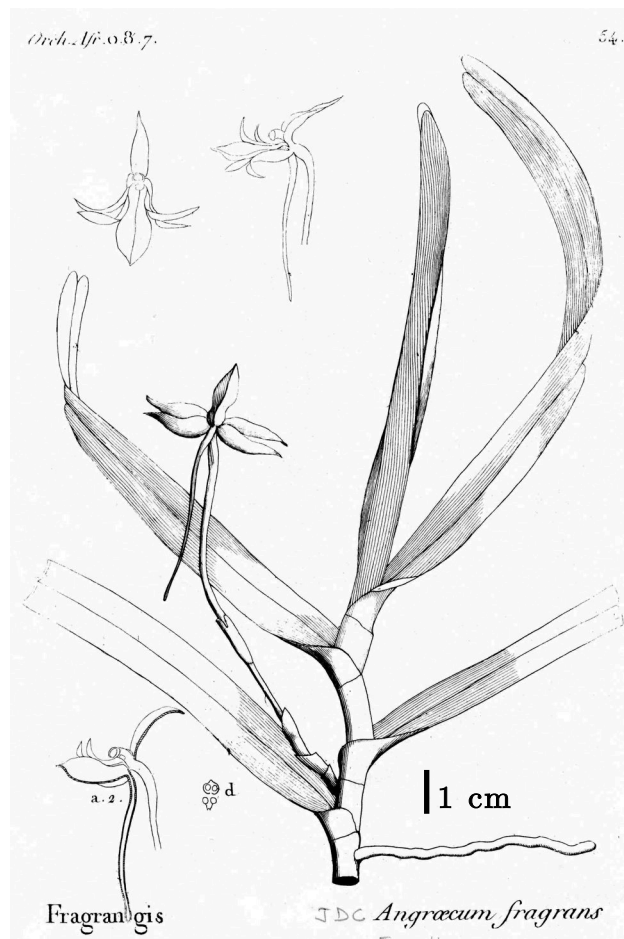


Figure 2.5. Dessin d'un individu fleuri de *Jumellea fragrans* (Du Petit-Thouars, 1822) pouvant constituer le lectotype de l'espèce.

En 1967, le botaniste allemand Senghas décrit une nouvelle espèce pour La Réunion : *Jumellea rossii* Senghas à partir de matériel envoyé par le Professeur Rauh. *Jumellea rossii* est une espèce proche de *Jumellea fragrans* mais ayant suffisamment de caractères distinctifs pour justifier la validité de cette espèce. Dans sa description, les valeurs données par Senghas pour *Jumellea rossii* (dont le type conservé à Heidelberg [HEID] en Allemagne provient de Cilaos) correspondent parfaitement aux valeurs que nous avons mesurées pour les populations de CL et BV et à la forme de faham présentée en Figure 2.1. De plus, les dessins et les photographies publiées par Senghas dans la description de *Jumellea rossii*, permettent clairement d'identifier les individus de BV et CL comme appartenant à cette espèce. Lors de la dénomination de *Jumellea rossii*, Senghas ne semble pas avoir réalisé

d'étude critique du genre dans son ensemble ni des espèces du genre aux Mascareignes. Ainsi de nombreux spécimens historiques (récoltés avant la création de *Jumellea rossii*) qui se rattachent à l'espèce *Jumellea rossii* et identifiés comme *Jumellea fragrans* n'ont pas été étudiés par Senghas à en croire l'absence de référence à ces échantillons dans sa publication en 1967 et l'absence de *determinavit* sur les herbiers concernés. Il en résulte que de nombreuses identifications postérieures à la publication de *Jumellea rossii* Senghas n'ont pas été correctement effectuées. Ainsi plusieurs ouvrages (Lavergne 1990; Benke 2004; Stewart *et al.* 2006) illustrant *Jumellea rossii* Senghas, ainsi que certaines publications scientifiques (Shum Cheong Sing *et al.* 1992; Jacquemyn *et al.* 2005, 2007b; Micheneau *et al.* 2008a) utilisent le nom *Jumellea fragrans* pour désigner *Jumellea rossii* Senghas. Ces erreurs ont eu aussi pour effet de semer la confusion sur les critères de protection des espèces. Pour ces différentes raisons, il s'avère nécessaire de pouvoir distinguer clairement *J. rossii* de *J. fragrans* en définissant des critères simples permettant d'identifier chacune de ces deux espèces.

2.5.3. Caractères morphologiques discriminants les deux espèces

Afin de permettre une identification rapide des individus sur le terrain, il est utile d'utiliser des caractères suffisamment discriminants. Dans la mesure du possible, il s'agit de choisir des caractères simples, macroscopiques et pérennes facilitant ainsi la détermination *in natura*. Les analyses multivariées sur les caractères végétatifs et reproducteurs séparent nettement les individus de *Jumellea fragrans* (ML) de ceux de *Jumellea rossii* (BV et CL). Cependant, tous les caractères mesurés ne participent pas de manière égale à la séparation des individus en deux groupes. Ainsi, 3 caractères, faciles à mesurer sur le terrain, peuvent être retenus : longueur et largeur des feuilles et longueur de l'éperon. Les deux premiers caractères sont mesurables toute l'année et le dernier uniquement en période de floraison. Un individu possédant

des feuilles de longueur supérieure à 85 mm et de largeur supérieure à 14 mm sera déterminé comme appartenant à l'espèce *Jumellea fragrans*. Concernant la fleur, un éperon de plus de 30 mm sera associé à *J. fragrans*.

2.5.4. Implications pour la conservation du faham

Dans le dossier de presse de la Liste Rouge des espèces menacées en France réalisée pour la flore vasculaire de l'île de La Réunion (UICN France *et al.* 2010), le risque d'extinction de *Jumellea fragrans* (qui regroupe en réalité *J. rossii* et *J. fragrans*) n'a pas été évalué pour cause de données insuffisantes. L'une des premières recommandations est de reconnaître l'existence de deux espèces bien distinctes : *J. rossii* et *J. fragrans*. Cette dernière espèce étant inféodée à la forêt tropicale humide de basse altitude, possède actuellement une aire de distribution très limitée et fragmentée (données non publiées). De plus, son taux d'occurrence en forêt naturelle est particulièrement faible (Jacquemyn *et al.* 2005 où l'espèce est identifiée sous le nom de *Jumellea* sp aff *stipitata*). En effet, la forêt mégatherme hygrophile, appelée localement forêt de bois de couleurs des bas, a été massivement défrichée en faveur de l'urbanisation et de la culture de la canne à sucre. Aujourd'hui, il subsiste moins de 5% de la surface originelle de l'habitat de *J. fragrans*. Les vestiges les mieux préservés constituent la Réserve Naturelle Nationale de Mare-Longue, désormais intégrée dans le cœur du Parc National de La Réunion. Dans l'ouest, la forêt de bois de couleurs des bas a quasiment disparu. La distribution très limitée de l'espèce et la fragmentation de son habitat constituent à eux seuls des critères suffisants pour faire figurer *J. fragrans* dans la catégorie VU (vulnérable) des espèces menacées de la Liste Rouge de l'UICN. Par ailleurs, du fait de sa cueillette illégale, un statut de protection par arrêté ministériel ou préfectoral est recommandé. Parallèlement, des actions de sensibilisation du public ainsi que la mise en culture de production de cette espèce permettraient de réduire la pression de prélèvement pour l'approvisionnement du

marché local. En ce qui concerne, *J. rossii*, son l'aire de répartition est plus large puisque qu'on la retrouve dans différents types d'habitats au dessus de 600-700 m d'altitude (voir Jacquemyn *et al.* 2005 ou l'espèce est identifiée sous le nom de *J. fragrans*). Ces habitats sont relativement bien conservés puisqu'ils représentent entre 50 et 80 % de leur surface originelle (Strasberg *et al.* 2005) et sont peu fragmentés. Néanmoins, la disparition de certaines populations de la Plaine des Fougères, et de la Plaine des Tamarins, Pailler com. pers.) suite au braconnage, témoigne de la nécessité d'approfondir les connaissances sur la distribution géographique et la dynamique des populations de *J. rossii* afin d'évaluer au mieux le risque d'extinction.

Enfin, dans une optique de conservation, il apparaît incontournable d'évaluer la diversité génétique des ces deux espèces au sein et entre les populations. Ceci permettrait d'estimer leur capacité à s'adapter aux changements environnementaux. Les populations présentant une faible variation génétique sont souvent plus vulnérables à l'arrivée de nouvelles maladies, à la pollution, au changement climatique ou à la destruction de l'habitat. L'inaptitude d'une espèce à s'adapter aux changements augmente sensiblement son risque d'extinction (Frankham *et al.* 2002).

2.6. Remerciements

Les auteurs remercient Stéphanie Dafreville, Djothi Carpaye et Erwan Nicolas pour leur aide précieuse sur le terrain et pour les mesures morphologiques ainsi que Jean Bosser pour l'accès à l'herbier du Muséum national d'histoire naturelle de Paris [P]. Cette étude est financée par le National Geographic Society, le Conseil Général de la Réunion, la Société Botanique de France de et le Conseil Régional de la Réunion.

3 Delineation of evolutionary significant units in the Mascarene endemic Faham complex (*Jumellea* spp.) from genetic and ecological distinctiveness.

Bertrand Mallet¹, Laurence Humeau¹, Claudia Baider², Laury Blambert¹ & Thierry Pailler¹.

¹*UMR Peuplements Végétaux et Bio-agresseurs en Milieu Tropical, Université de la Réunion, Ile de La Réunion, France.*

²*The Mauritius Herbarium, R. E. Vaughan Building, MSIRI, Reduit, Mauritius.*

En préparation pour *Conservation Genetics*

Keywords: microsatellites, adaptive morphology, oceanic island, Evolutionary Significant Unit, conservation status, *Jumellea*, Orchidaceae

3.1. Présentation de l'article

3.1.1. Résumé

La conservation des flores insulaires nécessite une connaissance approfondie des processus écologiques et évolutifs qui produisent et maintiennent leur diversité. L'archipel des Mascareignes est caractérisé par un degré élevé d'endémisme particulièrement sensible à l'extinction. Alors que le niveau taxinomique de l'espèce reste largement utilisé comme unité de gestion dans cet archipel, des études récentes ont révélé que la taxinomie traditionnelle ne reflète pas systématiquement l'histoire évolutive sous-jacente des taxons ayant récemment radié et peut donc entraver l'élaboration de mesures de gestion et de conservation efficaces. Dans cette étude, la structure des populations a été évaluée chez *J. rossii* et *J. fragrans*, deux orchidées épiphytes endémiques des Mascareignes présentant de forts enjeux de conservation. Plus particulièrement, la relation entre la divergence génétique neutre et phénotypique adaptative entre les populations est examinée à partir de 13 marqueurs microsatellites nucléaires et 10 caractères floraux morphologiques. Les résultats révèlent que *J. rossii* et *J. fragrans* forment deux groupes distincts à l'égard de la variation morphologique et génétique confirmant la partition taxinomique en deux espèces distinctes. En outre, au sein de chaque espèce, les populations sont génétiquement différenciées selon le type d'habitat et chez *J. fragrans*, les données d'haplotypes chloroplastiques indiquent que la différenciation est probablement ancienne. Ces résultats permettent de définir trois unités évolutives distinctes pour la conservation dont le risque d'extinction doit être évalué séparément. La première unité est représentée par *J. rossii* et n'apparaît pas menacée. La seconde unité comprend les populations de *J. fragrans* des forêts humides et peut être classée comme vulnérable. La troisième unité comprend les populations de *J. fragrans* des forêts semi-sèches et devrait être classée en danger d'extinction.

3.1.2. Abstract

Conservation of oceanic island floras requires extensive knowledge of ecological and evolutionary processes that produce and maintain their diversity. Mascarene islands are characterized by a high endemism particularly sensitive to extinction. While species are largely used as management units in this archipelago, recent studies revealed that taxonomy only based on morphology does not reflect the underlying evolutionary history in recently radiated taxa and may thus hinder the design of appropriate management and conservation measures. In this study, population structure was assessed within and among *J. fragrans* and *J. rossii*, two epiphytic orchids endemic to Mascarene Islands that present strong conservation and taxonomic issues. Particularly, we examine the relationship between neutral genetic and adaptive phenotypic divergence among populations, using 13 nuclear microsatellite markers and 10 morphological floral traits. Results reveal that *J. rossii* and *J. fragrans* form two distinct groups with regard to neutral genetic and adaptive morphological variation confirming the taxonomic partition in two distinct species. Moreover, within each species, populations are genetically differentiated according to their habitat type and within *J. fragrans*, data from chloroplast haplotypes indicate that differentiation is probably ancient. These results are used to define three distinct evolutionary units for conservation whose extinction risk is evaluated separately. The first is represented by *J. rossii* that can be classified as Least Concern. The second includes populations of *J. fragrans* from rainforests and can be classified as Vulnerable. The third comprises populations of *J. fragrans* from semi-dry forests and should be classified as Endangered.

3.2. Introduction

Oceanic islands have long been considered as natural laboratories for plant evolution studies (Darwin 1859; Stuessy & Ono 1998). They contribute disproportionately high to global plant biodiversity relative to their small area with about one quarter of all known extant vascular plant species which are endemic to islands (Kreft *et al.* 2008). Adaptive radiation in different habitats and genetic drift are regarded as main processes producing such extensive speciation (Stuessy & Ono 1998; Losos 2010). Oceanic islands also provide many cases of species extinction with 50 documented plant extinctions out of 80 in the last 500 years concerning island species according to the International Union for Conservation of Nature (IUCN) database (Sax & Gaines 2008). Plant species in islands are particularly sensitive to several threats (Vitousek 1988; Frankham 1998) and human activities have profoundly affected island ecosystems through habitat loss, habitat degradation and fragmentation and invasion by exotic species (Kingsford *et al.* 2009). Many oceanic islands have therefore been considered in biodiversity hotspots defined by Conservation International (Myers *et al.* 2000; Mittermeier *et al.* 2005).

The Mascarenes together with Madagascar and other nearby Indian Ocean islands represent one of the 34 biodiversity hotspots (Myers *et al.* 2000; Mittermeier *et al.* 2005), characterized by relatively low species diversity but high endemism which is typical of isolated and high elevated oceanic islands (Whittaker *et al.* 2008). Therefore, 688 angiosperm species are endemic to the archipelago which represent 72% of the total flowering plant species (Caujapé-Castells *et al.* 2010). Nowadays, 50% of these endemic species are red listed in one of three categories of threat (Critically Endangered, Endangered and Vulnerable) according to IUCN criteria (IUCN 2012) and 40 extinctions of plants were reported (Caujapé-Castells *et al.* 2010). However, recent resolutions of taxonomic difficulties using DNA sequence data revealed that current taxonomic circumscriptions fail to reflect the evolutionary

history (Le Péchon *et al.* 2010; Plunkett & Lowry 2010; Rakotoarivelo *et al.* 2012) whose knowledge is required to design appropriate management and conservation measures (Crandall *et al.* 2000). In addition, conservation plans in islands have usually focused on biodiversity pattern only, ignoring evolutionary processes (Moritz 2002). The concept of Evolutionarily Significant Unit (ESU) was developed to provide an objective approach for prioritizing units for conservation management independently of their taxonomic level (Ryder 1986; Mace 2004). In his most integrative definition, an ESU is a group of populations forming unique adaptive entity and its identification should be based on the study of adaptive divergence in fitness related traits together with neutral marker divergence (Crandall *et al.* 2000; Fraser & Bernatchez 2001). While such approach has, in our knowledge, never been used in Mascarenes, some phylogenetic studies suggested that adaptation to diverse habitats has driven radiation in the archipelago (Le Péchon *et al.* 2010; Strijk *et al.* 2012; Razafimandimbison *et al.* 2014) and more conservation oriented studies identified habitats and their interfaces along the lowland-upland gradient as spatial components of biodiversity processes (Strasberg *et al.* 2005; Lagabrielle *et al.* 2009).

In the southwest Indian Ocean, orchids are represented by more than 1000 species in more than 50 genera (de Cordemoy 1899). In Réunion, they are found in all natural habitats between 0 and 2800 m a.s.l. and each habitat type contains between 20 and 40 species of orchids (Jacquemyn *et al.* 2007b). Habitat diversity associated with altitudinal gradient control orchid species composition and the distribution of orchid breeding systems which can suggest adaptation to different pollinator community compositions along these gradients (Jacquemyn *et al.* 2005). Thus, this family constitute an excellent model to study the relation between neutral genetic differentiation and adaptation to different habitats in closely related taxa. In addition, although 41 orchid species are currently listed as threatened or extinct in the Regional Red List, 43 are not assigned because of data deficiency (IUCN France *et al.* 2013). Among these species, *Jumellea fragrans* (Thouars) Schlechter and *J.*

rossii Senghas are two sister species that present strong conservation issues. Traditionally, leaves and stems of *J. rossii* are wild-harvested and traded through local markets for their aromatic and medicinal properties (Dorvault 1886; Lavergne 1990; Shum Cheong Sing *et al.* 1992). Because of their morphological similarity, *J. rossii* and *J. fragrans* are confounded and therefore this latter is also harvested. Moreover, these species have long been confused in the taxonomy which prevented to appropriately assess their risk of extinction (Mallet *et al.* 2012).

The objectives of the present study were: (1) to assess whether genetic and morphological structure correspond to current taxonomic delineation of the species; (2) to examine the role of habitat in neutral and adaptive population differentiation and (3) to propose conservation units based on ecological and genetic distinctiveness and assess their threat categories according to IUCN criteria.

3.3. Materials and methods

3.3.1. Study area and species

Mascarene archipelago comprises three main islands, Réunion (2500 km², 2 My), Mauritius (1800 km², 7 My) and Rodrigues (110 km², 9 My), situated in the western Indian Ocean, at respectively 800, 1000, and 1500 km from the eastern coast of Madagascar. Réunion is the largest island of the archipelago with an active volcano and a high altitudinal gradient (to 3070 m a.s.l., the highest point in Indian Ocean). Due to this complex topography combined with a strong asymmetry in rainfall between the east and west, Réunion shows numerous and diverse habitats which approximately 30% of the original surface still remains following human settlement (Strasberg *et al.* 2005). However, lowland habitats have been the most severely reduced by human transformation or invaded by exotic species with less than 15% of original extent intact for lowland rainforest and less than 5% for semi-dry forest

(Strasberg *et al.* 2005). In Mauritius, less than one per cent has been preserved (Vaughan & Wiehe 1937; Florens 2013).

Jumellea fragrans (Thouars) Schlechter and *Jumellea rossii* Senghas are long-lived epiphytic orchids that form dense clumps of 20-50 cm high stems, each stem producing one to five white flowers. Each flower emits a sweet fragrance at dusk to attract pollinators. These species are self-compatible but depend on pollinator for breeding (Blambert *et al.*, unpublished data). Geitonogamous pollination seems to be frequent in these species that rewards moth pollinators with a copious amount of nectar contained in a long spur (Mallet *et al.*, unpublished data). *Jumellea rossii* grows in mountain windward rainforest (MWR), mountain leeward rainforest (MLR), and submountain windward rainforest (SWR) in Réunion. In Mauritius, despite numerous surveys, only one specimen has been collected in 1967 in the upland wet forest of Macchabé and morphologically identified as *J. rossii* (Baider *et al.* 2012). *Jumellea fragrans* grows in lowland rainforest (LR) and lowland semi-dry forest (LSD) in Réunion and only one small population is known in the lowland semi-wet forest of Brise Fer in Mauritius (Baider *et al.* 2012).

3.3.2. Genotyping

Thirteen populations of *J. rossii* and 7 of *J. fragrans* spread over 5 habitat type were sampled between January and July 2012 in Réunion (sampling permit code from the Parc National de la Réunion: DIR/I/2012/002) representing a total of 621 plant individuals (see Table 3.1 for sampling details). Sampling method, DNA extraction, PCR conditions and genotyping protocol were completed as described in Humeau *et al.* (2010) with the same 13 microsatellite loci isolated from *J. rossii* and used in Mallet *et al.* (2014).

3.3.3. Genetic diversity

The mean observed number of alleles per locus (A_L) and the mean effective number of alleles per locus (A_E) were computed for each population, for each habitat and for each species using GenAlEx 6.5 (Peakall & Smouse 2006, 2012). Expected heterozygosity over all loci (H_E), observed heterozygosity over all loci (H_O), multilocus F_{IS} estimated through the fixation index of Weir and Cockerham (Weir & Cockerham 1984) were also calculated for each population, for each habitat and for each species using Genepop 4.0 (Rousset 2008). The exact tests of Guo and Thompson (Guo & Thompson 1992) based on Markov chain iteration were used to test for departures from Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE).

3.3.4. Neutral genetic structure

Pattern of genetic variation across the faham complex was first examined by a Principal Coordinate Analysis (PCoA) in Genalex 6.5 (Peakall & Smouse 2006, 2012). Genetic structure was then assessed without a priori inferring genetic clusters from multi-locus genotypes using sequential k-means clustering for $k = 1$ to $k = 40$ after transforming the data with a PCA. To identify the best number of clusters, different clustering models were compared using Bayesian Information Criterion. For the models retained, description of relationship between genetic clusters and membership probabilities of each individual for the different groups were obtained performing a Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC; Jombart *et al.* 2010) with genetic clusters as grouping factor. In order to test whether genetic differentiation is structured by habitats, DAPC was also performed with habitat type as grouping factor. All these analyses were achieved with the adegenet package 1.3-4 (Jombart 2008) for R 2.15.1 (R Development Core Team 2012).

Table 3.1. Characteristics of the studied populations of faham.

Population	Code	Longitude	Latitude	Altitude	N_m	N_g
<i>Jumellea rossii</i>					151	522
<i>Mountain Windward Rainforest</i>	<i>MWR</i>				58	285
Bélouve	BL	55°31'53"E	21°03'56"S	1590 m	16	61
Plaine des Fougères	PF	55°31'04"E	20°58'29"S	1220 m	-	23
Plaine des Fougères 2	PF2	55°30'10"E	20°58'48"S	1430 m	16	22
Bébour	BB	55°35'23"E	21°05'52"S	1140 m	11	50
Bébour-Takamaka	BBT	55°33'53"E	21°06'32"S	1370 m	15	48
Anchaing	AN	55°29'53"E	21°02'35"S	1320 m	-	29
Ilet à Guillaume	IG	55°25'01"E	20°57'38"S	1200 m	-	52
<i>Mountain Leeward Rainforest</i>	<i>MLR</i>				42	124
Saint-Paul	SP	55°22'26"E	21°01'14"S	1390 m	17	50
Les Makes	MK	55°23'36"E	21°12'35"S	1120 m	-	34
Cilaos	CL	55°29'21"E	21°07'27"S	1400 m	25	40
<i>Submountain Windward Rainforest</i>	<i>SWR</i>				51	113
Mourouvain	MR	55°44'52"E	21°08'37"S	550 m	16	21
Dugain	DG	55°34'07"E	20°58'42"S	770 m	20	52
Basse-Vallée	RBV	55°42'16"E	21°19'30"S	850 m	15	40
<i>Jumellea fragrans</i>					38	99
<i>Lowland rainforest</i>	<i>LR</i>				28	74
Mare-Longue	ML	55°44'23"E	21°21'07"S	260 m	15	38
Basse-Vallée	FBV	55°44'23"E	21°21'12"S	350 m	13	34
Salazie	SZ	55°35'14"E	21°00'05"S	230 m	-	2
<i>Lowland semi-dry forest</i>	<i>LSD</i>				10	25
Montauban	MB	55°29'28"E	20°56'50"S	590 m	-	3
Ravine à Marquet	RM	55°22'05"E	20°57'48"S	710 m	8	15
Patate à Durand	PAT	55°27'51"E	20°56'04"S	520 m	-	2
Maurice	MA	57°26'20"E	20°22'20"S	580 m	2	5

N_m and N_g , number of sampled individuals for morphometric and genetic analyses respectively.

3.3.5. Adaptive phenotypic structure

Floral morphology in rewarding orchids is well known to reflect pollinator adaptation, particularly in angraecoid orchids (Nilsson *et al.* 1987; Wasserthal 1997; Micheneau *et al.* 2006, 2008; Mallet *et al.* unpublished data). Floral traits were thus used to assess adaptive phenotypic structure in this study. Flowers were sampled from 13 out of the 20 populations genotyped (see Table 3.1 for sampling details). In each population, one to four mature flowers were harvested from 2 to 25 randomly sampled individuals for a total of 178 individuals and 454 flowers, and stored in 70% ethanol. For each flower, ten traits were measured using a digital calliper (to 0.01 mm): spur length, column height, lip length and width, lateral petal length and width, adaxial sepal length and width, lateral sepal length and width. From this multivariate dataset, the same analyses (PCoA, k-means clustering, DAPC with cluster, DAPC with habitat type) as those carried out for the genetic structure were conducted.

3.3.6. Definition of conservation units and assessment of their extinction risk

Conservation units were defined following the approach of Crandall *et al.* (2000) that integrates ecological and genetic variation. In this approach, categories of ecological and genetic distinctiveness of populations are determined from rejection or not of the null hypotheses of ecological and genetic exchangeability for both recent and historical time frames (see Fig. 1 in Crandall *et al.* 2000). Genetic exchangeability is rejected when there is evidence of restricted gene flow between populations and ecological exchangeability is rejected when there is evidence of ecological niche differentiation (Crandall *et al.* 2000) In this study, historical and recent genetic exchangeability were rejected when there was evidence of isolation respectively from chloroplast sequences (ongoing work ; three sequences were tested for polymorphism ; *rpl32-trnL*, *trnQ-rps16*, *psbJ-petA* ; only the latter was

polymorphic) and nuclear microsatellites. Concerning historical ecological exchangeability, no data were available for the study species. Recent ecological exchangeability was considered as rejected when there was evidence of morphological differentiation and/or habitat differentiation.

Then, for each conservation unit, extinction risk was assessed using the total extent of occurrence (EOO) as defined by IUCN (2012). As conservation units were defined from ecological exchangeability, sites of present occurrence of each conservation unit were inferred from the area containing only suitable habitat. Here, EOO of each conservation unit thus represented the maximum extent of occurrence and was probably an overestimation of the real EOO. Using the criterion B of IUCN, each conservation unit could be classified in a threat category but this criterion is mainly based on absolute thresholds that cannot act as a valid reference for small islands (Martín 2009). Criterion A, based on relative thresholds was thus used to assess threat categories.

3.4. Results

3.4.1. Genetic diversity

All the 13 microsatellites markers were successfully cross-amplified in *J. fragrans* except P2G8. This locus was thus excluded from subsequent analyses. Variation in estimates of within-population average genetic diversity over loci was relatively wide with A_E ranging from 1.5 in Montauban to 6.4 in Cilaos and H_E ranging from 0.229 in Patate à Durand to 0.779 in Cilaos (Table 3.2). However, the lowest values of genetic diversity ($A_E < 3.0$ and $H_E < 0.400$) were all associated to populations with a very small sampling size ($N < 5$). When genetic diversity was calculated within habitat, values were similar between habitats (with a mean $A_E = 5.5$ and a mean $H_E = 0.715$) except for lowland rainforest where genetic diversity was low ($A_E = 2.2$ and $H_E = 0.487$). Observed heterozygosity (H_O) averaged over all loci varied widely across all

populations, with values ranging from 0.125 to 0.642 and were always (except for Patate à Durand) lower than corresponding expected heterozygosities (Table 3.2). In all but one populations (Montauban), significant heterozygote deficits were found, indicated by positive F_{IS} and departure from Hardy-Weinberg equilibrium (Table 3.2).

Table 3.2. Mean genetic variability at 13 microsatellites loci per population, per habitat type and per species.

Population	<i>N</i>	<i>A_L</i>	<i>A_E</i>	<i>H_O</i>	<i>H_E</i>	<i>F_{IS}</i>	HWE
BL	59	9.3 ± 1.1	4.0 ± 0.5	0.372 ± 0.051	0.673 ± 0.063	0.455	***
PF	21	8.2 ± 1.0	5.1 ± 0.7	0.399 ± 0.048	0.727 ± 0.070	0.467	***
PF2	22	5.3 ± 0.4	1.9 ± 0.2	0.295 ± 0.062	0.419 ± 0.048	0.317	***
BB	50	9.3 ± 0.9	5.0 ± 0.7	0.411 ± 0.040	0.733 ± 0.060	0.447	***
BBT	48	9.1 ± 1.0	5.3 ± 0.6	0.642 ± 0.0584	0.745 ± 0.066	0.148	***
AN	29	9.7 ± 0.8	5.3 ± 0.7	0.498 ± 0.046	0.745 ± 0.060	0.347	***
IG	51	9.3 ± 0.9	5.0 ± 0.5	0.471 ± 0.046	0.744 ± 0.061	0.377	***
SP	49	10.3 ± 1.1	6.3 ± 0.8	0.472 ± 0.041	0.777 ± 0.058	0.400	***
MK	34	9.3 ± 0.9	5.8 ± 0.7	0.395 ± 0.055	0.761 ± 0.064	0.493	***
CL	40	11.1 ± 1.1	6.4 ± 0.8	0.598 ± 0.052	0.779 ± 0.061	0.244	***
MR	21	5.6 ± 0.5	3.6 ± 0.4	0.348 ± 0.042	0.668 ± 0.053	0.497	***
DG	52	9.5 ± 1.1	4.9 ± 0.8	0.488 ± 0.045	0.709 ± 0.068	0.321	***
RBV	39	9.0 ± 0.9	4.3 ± 0.5	0.434 ± 0.045	0.699 ± 0.067	0.389	***
ML	38	5.2 ± 0.8	2.3 ± 0.3	0.350 ± 0.063	0.492 ± 0.056	0.303	***
FBV	34	3.8 ± 0.6	2.1 ± 0.2	0.309 ± 0.058	0.455 ± 0.056	0.336	***
MB	3	1.9 ± 0.3	1.5 ± 0.3	0.250 ± 0.083	0.259 ± 0.072	0.234	NS
SZ	2	1.8 ± 0.1	1.7 ± 0.1	0.125 ± 0.065	0.344 ± 0.062	0.800	**
RM	15	6.3 ± 0.8	4.2 ± 0.4	0.407 ± 0.067	0.699 ± 0.066	0.447	***
MA	5	5.5 ± 0.6	4.7 ± 0.5	0.583 ± 0.083	0.745 ± 0.034	0.445	***
PAT	2	1.7 ± 0.3	1.6 ± 0.3	0.292 ± 0.130	0.229 ± 0.085	0.435	**
<i>MWR</i>	280	15.4 ± 1.5	6.4 ± 0.9	0.453 ± 0.044	0.769 ± 0.064	0.414	***
<i>MLR</i>	123	13.6 ± 1.4	7.6 ± 0.9	0.492 ± 0.045	0.801 ± 0.063	0.389	***
<i>SWR</i>	112	11.8 ± 1.4	5.2 ± 0.7	0.444 ± 0.038	0.732 ± 0.067	0.398	***
<i>LR</i>	74	6.3 ± 1.0	2.2 ± 0.2	0.325 ± 0.056	0.487 ± 0.054	0.339	***
<i>LSD</i>	25	10.1 ± 1.2	6.0 ± 0.7	0.415 ± 0.065	0.785 ± 0.044	0.485	***
<i>J. rossii</i>	515	18.8 ± 1.7	7.2 ± 1.0	0.460 ± 0.042	0.788 ± 0.065	0.417	***
<i>J. fragrans</i>	98	11.3 ± 1.4	3.1 ± 0.3	0.347 ± 0.053	0.631 ± 0.041	0.454	***

N, mean sample size per locus; *A_L*, mean number of alleles per locus ± s.e.; *A_E*, mean number of effective alleles per locus ± s.e.; *H_E*, expected heterozygosity over all loci ± s.e.; *H_O*, observed heterozygosity over all loci ± s.e.; HWE, result of test for departures from Hardy–Weinberg Equilibrium, *** $P < 0.001$, ** $0.001 \leq P < 0.01$, NS $P > 0.05$; *F_{IS}*, fixation index of Weir and Cockerham.

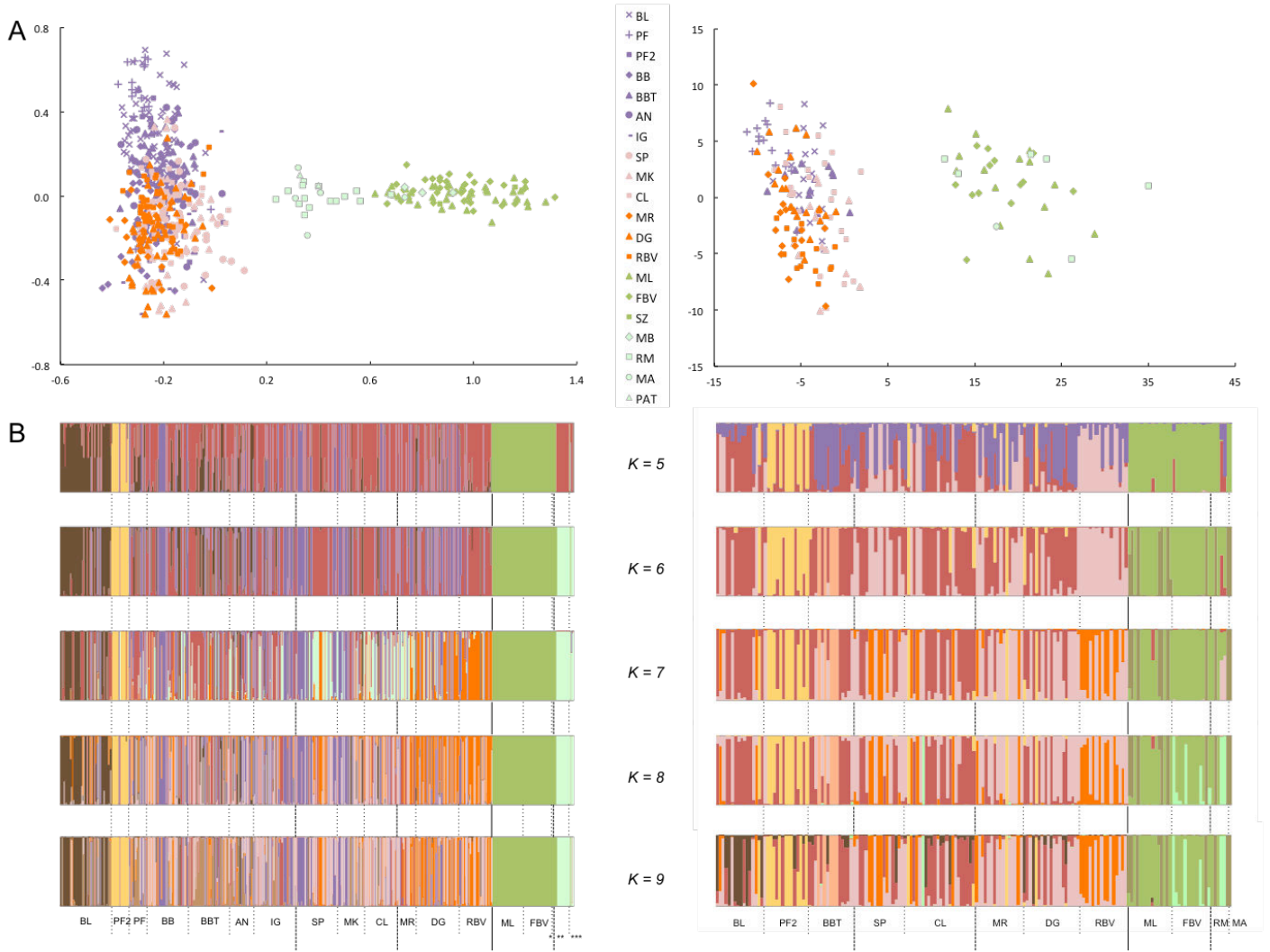


Figure 3.1. Population genetic (left) and morphological (right) structure inferred by (A) principal coordinate analysis on pairwise euclidean distances (colours correspond to the habitats) and (B) K-mean clustering followed by a discriminant analysis of principal components with clusters as grouping factors. Each individual is shown as a thin vertical line partitioned into K coloured components, representing inferred membership in K clusters. *MB, **RM, ***MA.

3.4.2. Genetic and phenotypic clustering

Both PCoA based on genetic and morphological data showed an obvious separation between *J. rossii* and *J. fragrans* along the first axis, which accounted respectively for 45.1% and 84.7% of the total variance (Figure 3.1A). Moreover, only on the PCoA based on genetic distances, individuals of *J. fragrans* were clearly separated in two groups along the first axis. These groups corresponded to the two

different habitats occupied by *J. fragrans*. The intermediate group between *J. fragrans* and *J. rossii* along the first axis was composed by individuals from lowland semi-dry forests.

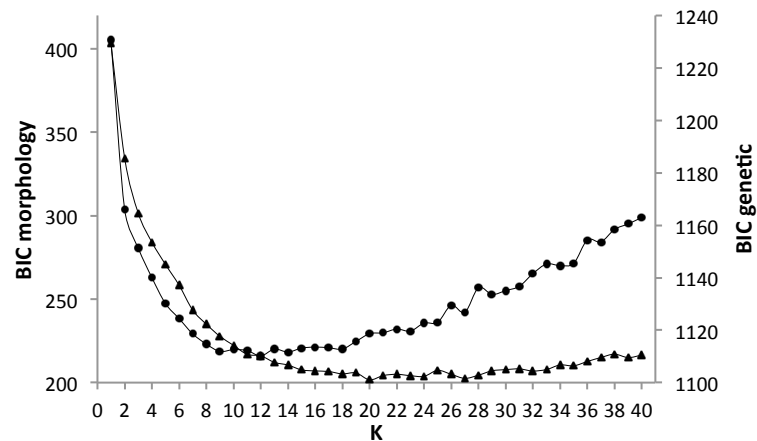


Figure 3.2. Detection of the best number of genetic (circle) and morphological (triangles) clusters K using K-means algorithm and the Bayesian Information Criterion (BIC).

Clustering analyses using k-means algorithm did not reveal a strong structure for both genetic and morphological data because there were no clear elbow in the curves of BIC values for increasing values of k (Figure 3.2). However, for the two curves, until $k = 5$ BIC strongly decreased and after $k = 9$, no substantial decrease was observed. Clustering models were thus presented for $k = 5$ to $k = 9$ and overall, they clearly discriminated individuals of each species in different clusters with some exceptions (Figure 3.1B). For genetic data, most individuals of *J. fragrans* from lowland semi-dry forests were well assigned in a cluster with individuals of *J. rossii* for $K = 5$ and $k = 7$ which was consistent with their intermediate position in the PCoA. For all other clustering models, these individuals formed a unique genetic cluster. Concerning floral morphology, the two species were better discriminated except for three individuals of *J. fragrans* assigned in a cluster with *J. rossii* for $k = 5$ and two individuals for $k = 6$ and $k = 7$ and one individual of *J. rossii* assigned in a cluster with *J. fragrans* for $k = 8$ and $k = 9$. Moreover, both genetic and morphological data revealed some populations of *J. rossii* forming unique cluster such

as Plaine des Fougères of which most individuals are assigned in an isolated cluster for all clustering models.

3.4.3. Genetic and phenotypic structure by habitat

DAPC scatterplots with habitat as grouping factor clearly showed a hierarchical structure both for genetic and morphological data (Figure 3.3). First, species were well separated by the first discriminant function and habitat within species are slightly discriminated by the second discriminant function with strong overlap in *J. rossii* for the two dataset and in *J. fragrans* only for morphology (Figure 3.3). Although these overlap among habitats within species on the scatterplots, DAPC assigned most individuals to their own habitat of origin with 84% and 82% of individuals well assigned for genetic and morphological datasets respectively (Figure 3.3). Moreover, the majority of individuals (74% and 60% for genetic and morphological datasets respectively) were strongly assigned to one of the habitats (assignment probability > 0.8).

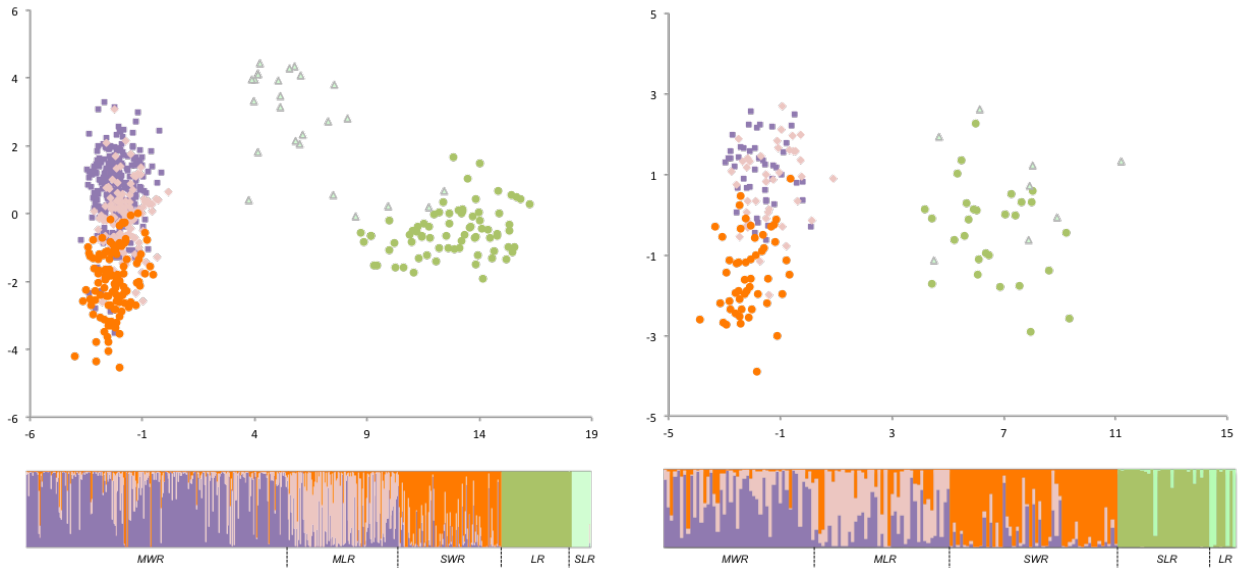


Figure 3.3. Population genetic (left) and morphological (right) structure inferred by a discriminant analysis of principal components with habitat as grouping factors. Each individual is shown as a thin vertical line partitioned into five coloured components, representing inferred membership in five habitat types.

3.4.4. Conservation units and extinction risk

Because of the high genetic (both for nuclear microsatellites and chloroplast sequences) and ecological differentiation (both for habitat type and floral morphology) between *J. fragrans* and *J. rossii*, the two hypotheses of genetic and ecological exchangeability were clearly rejected. Conservation units were thus determined separately for the two species. For *J. rossii*, DAPC showed that populations were genetically and morphologically structured by habitats indicating that the three habitats should be considered as distinct populations for conservation. In addition, cluster analyses revealed that some populations of *J. rossii* (Bélouve and Plaine des Fougères) were genetically and morphologically isolated suggesting that they should be treated as separated populations. However, haplotypes of the *petA-psbJ* chloroplastic region indicated that there was no evidence of historical isolation neither between habitats nor between special populations and others (data not shown). This corresponded to case 5 of distinctiveness of Crandall *et al.* (2000). For *J. fragrans*, clustering analyses and DAPC showed that populations were genetically and morphologically structured by habitats and chloroplast sequences indicated an historical genetic isolation between habitats (a unique and exclusive haplotype for populations from semi-dry forests). This corresponds to the case 2 of Crandall *et al.* (2000) which recommends to treat these units as distinct species. Three conservation units were thus proposed; the first including all populations of *J. rossii*, the second including all populations of *J. fragrans* from lowland rainforest and the third including all populations of *J. fragrans* from lowland semi-dry forest (Figure 3.4). The EOO of the first conservation unit was estimated as the sum of area containing suitable habitat for *J. rossii* and represented 507 km². The EOO of the second and the third conservation units were estimated as the area of the corresponding habitat and represented respectively 76 km² and 33 km² (Figure 3.4). The EOO of *J. rossii* has declined by less than 50% (Strasberg *et al.* 2005) and since the majority of populations are located in a protected area (National Park), this conservation unit

can be classified as ‘Least Concern’. In contrast, lowland rainforests and lowland semi-dry forests have respectively declined by more than 70% and 90% (Strasberg *et al.* 2005). *J. fragrans* from these habitats could thus be respectively classified as ‘Endangered’ and ‘Critically Endangered’.

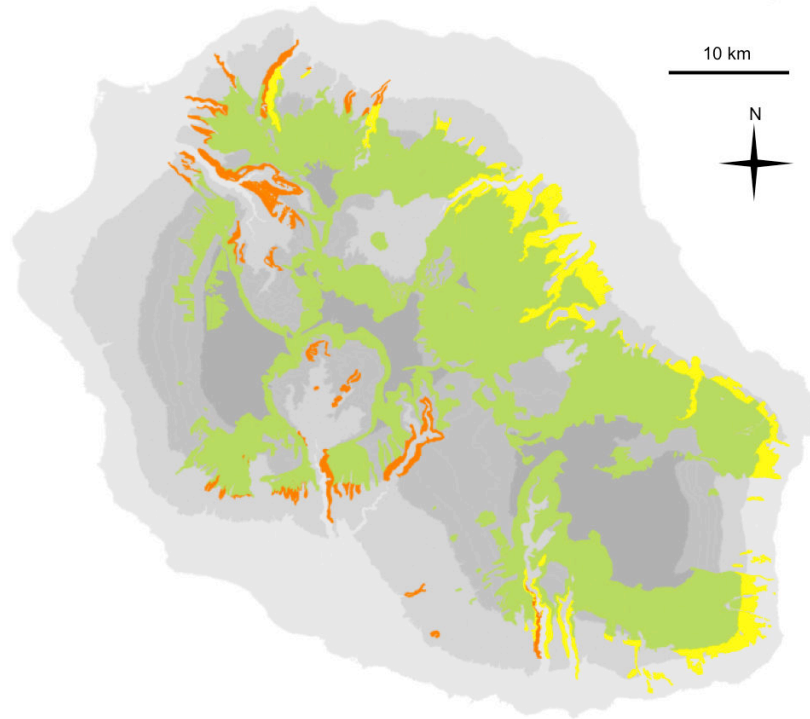


Figure 3.4. Potential extent of occurrence of each Evolutionary Significant Unit (ESU) inferred from suitable habitat types for each ESU. The green ESU represents *J. rossii*; the yellow one represents *J. fragrans* from lowland rainforest; the orange one represents *J. fragrans* from semi-dry forest. They could be respectively classified as ‘Least Concern’, ‘Endangered’ and ‘Critically Endangered’.

3.5. Discussion

3.5.1. Taxonomic delimitations

Despite taxonomic confusion in the use of their name, *J. rossii* and *J. fragrans* are actually described as distinct species from their morphological difference (Mallet *et al.* 2012). However, phylogenetic studies based on combined chloroplast (*matK*, *trnL-F*, *rps16*, *ycf1*) and nuclear (nrITS) markers failed to clearly distinguish these species (Micheneau *et al.* 2008a; Rakotoarivelo *et al.* 2012). In this study, highly polymorphic

nuclear and chloroplast markers were used to explore relationship between these species in combination with morphological traits. Clustering analyses and PCoA reveal that the faham complex is hierarchically structured from differences between species to differences between habitats within species and could correspond to different stages of the speciation continuum (Mallet 2008b; Nosil *et al.* 2009; Lowry 2012). According to Hendry (2009), speciation can be divided into four stages along this continuum: “(1) continuous variation within panmictic populations, (2) partially discontinuous variation with minor reproductive isolation, (3) strongly discontinuous variation with strong but reversible reproductive isolation and (4) complete and irreversible reproductive isolation”. First, results demonstrate a good correspondence between taxonomically relevant morphological variation and genetic variation between *J. rossii* and *J. fragrans* with all individuals from different species forming different genetic clusters without admixture between them in most models. This case is close to the state 3 of the speciation continuum because reproductive isolation between these species is potentially reversible due to the absence of postzygotic isolation (Mallet *et al.*, unpublished data). Second, within *J. fragrans*, individuals from different habitats show discontinuous variation in floral morphology with partial reproductive isolation and are thus close to the state 2 of the continuum. Finally, within *J. rossii*, individuals from different habitats present a partially discontinuous variation in floral morphology with minor reproductive isolation (Mallet *et al.* 2014), which corresponds to the state 2 of the continuum. Current taxonomy of the faham complex recognizing two distinct species thus reflects a real evolutionary history. Nevertheless, within each of the two species, variation of floral morphology and genetic isolation between habitats must be considered for conservative management practices.

3.5.2. Ecological-driven divergence

In Réunion, the complex orographic effect resulting from the north-to-south orientation of the two volcanoes have led to the development of a mosaic of diverse ecological conditions over short distances that can impose differential selection, thus providing strong opportunities for ecological speciation (Crawford & Stuessy 1997; Stuessy *et al.* 2006; Givnish 2010). DAPC performed on genetic data with habitat as grouping factor reveals that habitat heterogeneity induces marked reduction in gene flow between populations from different habitat types both at the inter- and at the intraspecific level. Moreover, DAPC performed on morphological traits shows that differentiation within species follows the same pattern of differentiation by habitat observed between species suggesting that ecological processes underlie both intra- and interspecific variation. For the two data sets, most of the variation is observed between species and corresponds to the transition between lowland forests and submountain/mountain forests. This differentiation between species was studied in details and revealed that prepollination barriers were predominant in maintaining reproductive isolation between *J. rossii* and *J. fragrans* with a likely strong role of adaptation to different pollinators (Mallet *et al.* unpublished data). Differentiation between habitats within species was explored in details in *J. rossii* and showed that this pattern may be the result of both asynchrony in flowering phenology and selection against migrants (Mallet *et al.* 2014).

3.5.3. Conservation implications

Applying the method proposed by Crandall *et al.* (2000), our results suggest that the faham complex is composed of three distinct evolutionary significant units that should be treated as distinct species. *J. rossii* represents one unit and *J. fragrans* is composed of two distinct units. However, evolutionary significant units are mainly used by academic research and has little impact on operational conservation where

the taxonomic rank of subspecies is used to take into account evolutionary divergent populations at the intraspecific level (Green 2005). For reasons of operability, we therefore suggest to describe two subspecies of *J. fragrans* corresponding to the evolutionary units.

The recognition of three different evolutionary units raises the conservation status of each. Our results suggest that *J. rossii* can be classified as ‘Least Concern’ while *J. fragrans* from rainforest and semi-dry forest can be respectively classified as ‘Endangered’ and ‘Critically Endangered’. For this latter evolutionary unit, we suggest to consider reintroduction strategies in order to reinforce natural populations. Attention should therefore focus on *ex situ* seed germination and cultivation as a priority for conservation. In this context, it is important to reintroduce individuals propagated *in vitro* from seeds from as many capsules as possible and from all known populations in Réunion.

3.6. Acknowledgements

We wish to thank Jacques Fournel and Sebastien Albert for locating and providing plant samples from Ravine à Marquet and Patate à Durand. We also thank Office National des Forêts, Parc National de la Réunion and Mare-Longue research station (Feder Réunion 2.02) for logistic support during fieldwork. This work was supported by the Conseil Général de la Réunion and by the University of Réunion.

4 Pollinator and habitat shifts promote ecological speciation between two orchid sister species in Réunion

Bertrand Mallet¹, Thierry Pailler¹, Florent Martos², Laury Blambert¹ & Laurence Humeau¹.

¹*UMR Peuplements Végétaux et Bio-agresseurs en Milieu Tropical, Université de la Réunion, Ile de la Réunion, France.*

²*School of Life Sciences, University of KwaZulu-Natal, Pietermaritzburg, South Africa.*

En attente de soumission pour le special issue ‘orchid conservation’ d’*Annals of Botany*

Keywords: *Jumellea rossii*, *Jumellea fragrans*, floral isolation, ecogeographic isolation, pollinator shift, ecological speciation

4.1. Présentation de l'article

4.1.1. Résumé

La diversification de niche écologique semble jouer un rôle clé dans la radiation des angiospermes sur les îles océaniques. Cependant, le lien de cause à effet entre le changement de niche et la mise en place de l'isolement, prédit par la théorie de la spéciation écologique, est rarement étudié dans la spéciation en milieu insulaire. Dans cette étude, cette question est abordée pour *Jumellea fragrans* et *J. rossii*, deux espèces d'orchidées qui ont récemment divergé à la Réunion. La différenciation génétique et phénotypique ainsi que l'isolement reproducteur entre ces espèces sont étudiés.

Les analyses de génétique des populations révèlent un niveau élevé d'isolement génétique entre les espèces suggérant un isolement reproducteur interspécifique efficace. Plusieurs barrières reproductives contribuent à empêcher le flux de gènes entre ces espèces. Tout d'abord, les collections d'herbiers et les prospections de terrain indiquent que les deux espèces sont parapatriques, qu'elles sont inféodées à des habitats distincts et que leur phénologie florale est légèrement chevauchante. Les analyses multivariées de la morphologie florale et du parfum floral montrent que les deux espèces ont des syndromes de pollinisation différents. *J. rossii* semble adaptée à la pollinisation par les phalènes tandis que *J. fragrans* semble plus adaptée à la pollinisation par les sphinx. Les observations indirectes des pollinisateurs naturels à l'aide de caméras indiquent que les espèces ont des pollinisateurs distincts, en accord avec les syndromes de pollinisations. Les expériences de pollinisations manuelles révèlent que les barrières post-pollinisation sont probablement absentes entre les espèces étudiées.

Ces résultats suggèrent que les barrières agissant avant la pollinisation sont principalement responsables de l'absence de flux de gènes entre *J. rossii* et *J.*

fragrans. Il est probable que, dans ce clade, la combinaison de plusieurs changements écologiques a pu être à l'origine de la mise place de l'isolement reproducteur et donc de la spéciation. Plus précisément, les changements de pollinisateur et d'habitat seraient à respectivement à l'origine des isolement floral et temporel ainsi que d'autres potentielles barrières reproductives telles que les différences la sélection contre les migrants. Dans l'ensemble, cette étude fournit des résultats cohérents avec la théorie de la spéciation écologique dans un contexte insulaire.

4.1.2. Abstract

Ecological shifts are thought to play a key role in radiation of angiosperms on oceanic islands. However, it is rarely clear whether such shifts contribute to reproductive isolation and ultimately to speciation as this is expected by the theory of ecological speciation. In this study, these questions are addressed for *Jumellea fragrans* and *J. rossii*, two orchid species that have recently diverged in Réunion. Here, genetic and phenotypic structure of populations and reproductive isolation between these species are documented.

Population genetics analysis showed a high level of genetic isolation between species that suggests an effective interspecific reproductive isolation. Several reproductive barriers help to prevent gene flow between these species. First, herbarium collections and field observations indicated that the two species were parapatric, occupied different habitats and their flowering phenology was asynchronous with a slight overlap between some populations. Multivariate analysis of floral morphology and floral scent revealed that the two species have different pollination syndromes. *J. rossii* is more adapted to pollination by moths whereas *J. fragrans* is more adapted to pollination by hawkmoth. Film observations of natural pollinators revealed that each species is pollinated by different insect species consistent with pollination syndromes. Hand pollination experiments showed that postpollination barriers were likely absent among our study species.

These results revealed that prepollination barriers are mainly responsible for the lack of gene flow between *J. rossii* and *J. fragrans*. We suggest that, in this system, ecological shift between moth and hawkmoth pollination has been able to lead to partial reproductive isolation along with other reproductive barriers such as flowering time differences and selection against migrants. Overall, this study provides results consistent with the theory of ecological speciation in an island context.

4.2. Introduction

Ecological shifts of populations, especially involving habitat and resource utilization, are an essential component of angiosperm diversification (Levin 2000; Givnish 2010). Indeed, several studies have shown that recently diverged sister species exhibit ecological shifts and tend to use different ecological niches (Whittall and Hodges 2007; van der Niet and Johnson 2009; Nakazato et al. 2010). Moreover, such shifts may result to the evolution of reproductive isolation and thus lead to ecological speciation (review in Schluter 2001; Rundle and Nosil 2005; Sobel et al. 2010). However, the relationship between ecological shift and reproductive isolation is poorly understood (Funk *et al.* 2006), particularly in flowering plants where empirical studies of reproductive isolation are still lacking (but see Lowry et al. 2008; Widmer et al. 2009 for reviews). According to the traits under divergent selection in different environments, different type of reproductive barrier can evolve. First, habitat-mediated selection can promote reproductive isolation through selection against immigrant between populations (at fine scale), through ecogeographic isolation (at the species range scale) or through temporal isolation. For example, reciprocal transplant experiments between coast and inland races of *Mimulus guttatus* revealed that reproductive isolation is primarily due to selection against immigrants related to adaptation to seasonal drought in inland habitat, soil moisture and salt spray in coastal habitat and flowering time differences between habitats (Lowry *et al.* 2008b). Second, pollinator-mediated selection can lead to the evolution of barriers to gene

flow and thus to reproductive isolation. Indeed, variation in floral traits between populations can drive both ecological shift through pollination niche partitioning and reproductive isolation through the resulting assortative mating. Such pollinator isolation has been extensively studied in monkey flowers (Schemske & Bradshaw 1999; Ramsey *et al.* 2003; Bradshaw & Schemske 2003) and in many other plant taxa (see Van der Niet *et al.* 2014 and references therein). Floral scent and spur length appear to be key traits in mediating pollinator isolation in orchids (Schiestl and Schlüter 2009) including angraecoid species (review in Micheneau *et al.* 2009). There is some evidence that, in many cases of ecological speciation, divergent selection is based on several ecological gradients (Nosil 2012). Habitat-mediated selection can thus occurs simultaneously to pollinator-mediated selection which may result in both ecogeographic and pollinator isolation (e.g. Ramsey *et al.* 2003).

By their nature, oceanic islands offer great opportunities to study ecological speciation. Indeed, in such systems, many cases of adaptive radiation from an ancestral ecological niche into numerous others are documented (Carlquist 1974; Stuessy & Ono 1998). The rapid ecological shift on oceanic islands results from the divergent selection within species or among closely related taxa for adaptation to different habitats and from the ability of these taxa to benefit of ecological opportunities (Losos 2010). This explanation is particularly true on younger oceanic islands which are topographically complex and, as a result, present a wide range of climatic and ecological conditions at small geographic scale (Whittaker *et al.* 2008). However, the link between adaptive radiation and ecological speciation remains to be assessed in these systems. Indeed, it is unclear whether the ecologically-based divergent selection occurring during adaptive radiation leads to the evolution of reproductive isolation and thus to ecological speciation (Schluter 2001).

Angraecoid orchids have long been known for their highly specialized floral structure (long spur containing sugar-rich nectar) and floral scent evolved to interact

with hawkmoths (Sphingidae) in Madagascar (review in Micheneau *et al.* 2009). In such systems, pollinator shift may cause an efficient pollinator isolation that may ultimately result in speciation but this issue is still little addressed in studies of pollinator-driven speciation (van der Niet *et al.* 2014). In Réunion, intra-island diversification of the *Hadrangis* section was strongly related to pollinator shift from hawkmoth pollination to orthopteran pollination and bird pollination with a strong reduction of spur length (Micheneau *et al.* 2006, 2008c, 2010). Due to the likely absence of the original pollinator of the orchid colonist during colonization of Réunion, new and heterogeneous pollination environments may have favoured floral divergence through pollinator-mediated divergent selection (Barrett 1996). However, it remains to be determined whether these pollinator shifts have primarily driven the evolution of reproductive isolation and causing divergence between these closely related species. Another consequence of the absence of pollinator in Réunion during colonization is the evolutionary shift from outcrossing to self-pollination for all endemic long-spurred species (Jacquemyn *et al.* 2005) leading to an evolutionary dead end (Takebayashi & Morrell 2001).

This study aims to investigate the extent of genetic divergence and reproductive isolation between *Jumellea fragrans* (Thouars) Schltr. and *Jumellea rossii* Senghas, two angraecoid sister species endemic to Mascarene Islands (Micheneau *et al.* 2008a; Rakotoarivelo *et al.* 2012) with intermediate spur length and that differ in habitat and morphology (Mallet *et al.* 2012). Specifically, this study aims to explore three prepollination barriers (geographic, temporal and pollinator), one postpollination prezygotic barrier (fruit production) and a very early postzygotic stage (proportion of viable seeds) between these two sister species.

4.3. Materials and methods

4.3.1. Study area and species

Réunion is located ca 800 km east of Madagascar (55°39'E; 21°00'S). It is a small (2512 km²) and young (about two million years) oceanic island in the Mascarene archipelago dominated by two volcanic massifs; one of them is still active (Piton de la Fournaise). This confers to Réunion a complex topography and a strong variation in rainfall from east (wet) to west (dry) and in temperature along the altitudinal gradient. As a result, Réunion is ecologically heterogeneous and presents highly diverse ecosystems despite its small surface area (Strasberg *et al.* 2005). Orchids represent nearly 20% of the original flora of Réunion and, in this family, species composition, breeding systems and floral traits vary largely along the altitudinal gradient (Jacquemyn *et al.* 2005).

Jumellea rossii Senghas and *Jumellea fragrans* (Thouars) Schltr. are long-lived epiphytic orchids (Figure 4.1A-B) that are respectively found in mid-altitude to mountain rainforest (between 500 and 1800 m a.s.l.) and lowland rainforest (below 500 m a.s.l.) in Réunion (Figure 4.2). The habitats of *J. rossii* are thus located in the rugged interior of the island and have been well preserved contrary to the lowland habitat of *J. fragrans*, which have been transformed through human activities. Thus, less than 16% of the original area of lowland rainforest remained intact while more than 50% of the windward mountain rainforest is retained (Strasberg *et al.* 2005). *J. rossii* and *J. fragrans* form dense clumps of 20-50 cm high stems, each stem producing one to five white flowers, and each flower emitting a pleasant, sweet fragrance at dusk and bearing a spur containing nectar (Figure 4.1C-D).

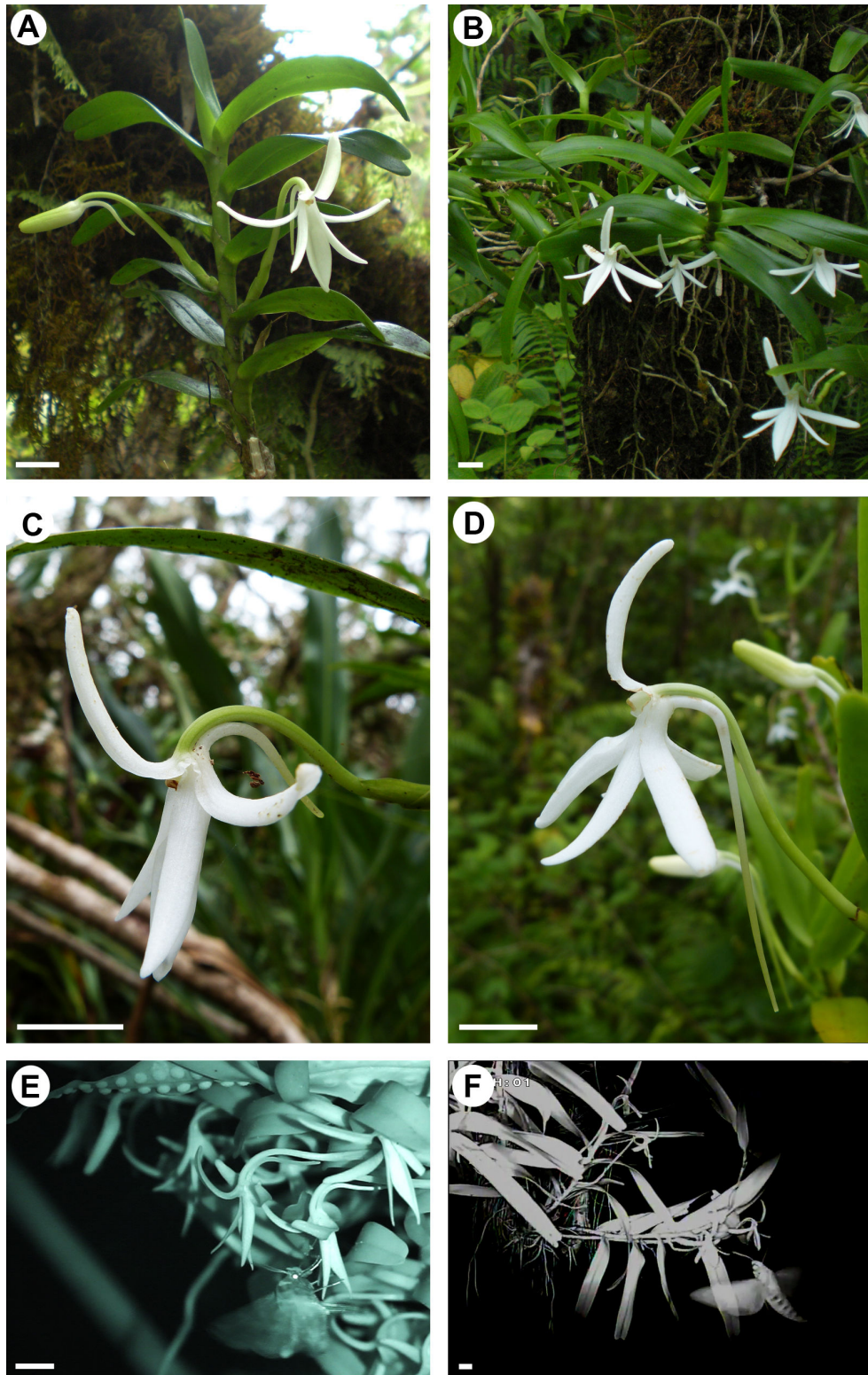


Figure 4.1. Floral morphology and pollinators of *Jumellea rossii* (left column) and *J. fragrans* (right column). (A-B) Details of one flowering stem. (C-D) Details of one flower showing the difference in spur length between species. (E) *Chrysodeixis chalcites* with pollinaria attached on its tongue and (F) *Agrius convolvuli* feeding on nectar (pictures taken from video-captures).

4.3.2. Genetic differentiation

Three populations of *J. rossii* and two populations of *J. fragrans* were sampled between January and July 2012 in Réunion (sampling permit code from the Parc National de la Réunion: DIR/I/2012/002); that is, a total of five populations and 210 plant individuals (see Table 4.1 and Figure 4.2 for sampling sizes and distribution of populations respectively). For each plant, leaf material was desiccated in the field with silica gel, and DNA was later extracted using a DNeasy® Plant mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). Individuals were genotyped for 12 nuclear microsatellite loci isolated from *J. rossii* and described in Humeau et al. (2010). PCR multiplexes with fluorescently labelled primers were performed as in Humeau et al. (2010). PCR fragments were resolved by capillary electrophoresis on an automated sequencer ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Allele sizes were determined using Genemapper analysis software (Applied Biosystems).

Table 4.1. Characteristics and sampling details of study populations of *Jumellea rossii* and *Jumellea fragrans*.

Species	Population	Code	Longitude	Latitude	Altitude	N_m	N_g	N_c
<i>Jumellea rossii</i>	Bébour-Takamaka	BBT	55°33'53"E	21°06'32"S	1370 m	15	48	3
	Saint-Paul	SP	55°22'26"E	21°01'14"S	1390 m	17	50	3
	Basse-Vallée	RBV	55°42'16"E	21°19'30"S	850 m	15	40	3
<i>Jumellea fragrans</i>	Mare-Longue	ML	55°44'23"E	21°21'07"S	260 m	15	38	3
	Basse-Vallée	FBV	55°42'11"E	21°21'12"S	350 m	13	34	-

N_m , N_g , N_c number of sampled individuals for morphometric, genetic and chemical analyses respectively

To determine the relative partitioning of total genetic variation among species, among populations within species, and within populations, an analysis of molecular variance (AMOVA; Excoffier et al. 1992) was performed. Additionally, to explore the genetic relationship among all sampled individuals, a principal co-ordinates analysis (PCoA) was achieved on Euclidean genetic distances. Both AMOVA and PCoA were completed using GenAlEx 6.5 (Peakall & Smouse 2006, 2012).

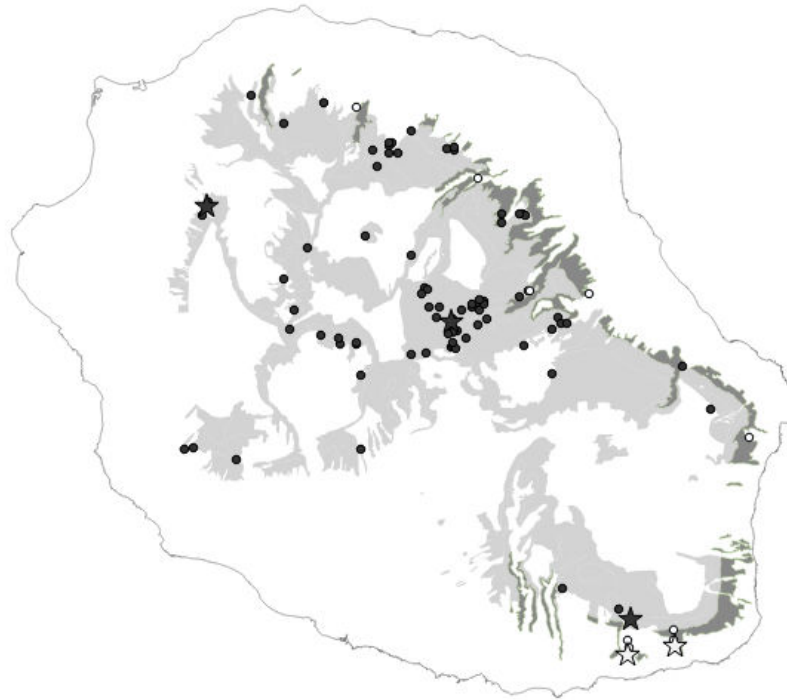


Figure 4.2. Estimated distribution of *Jumellea rossii* (light zones) and *Jumellea fragrans* (dark zones). Dots represent localities where the species were observed and stars represent study populations of *J. rossii* (filled symbols) and *J. fragrans* (open symbols).

4.3.3. Postmating isolation

Hand-pollination experiments were performed in the field, during the 2012 wet season, in the populations of Basse-Vallée (RBV) for *J. rossii* and Mare-Longue (ML) for *J. fragrans* because at this place, the flowering phenology of the two species can overlaps. Eighty-eight manual crosses were carried out on 48 individuals. To exclude uncontrolled pollinations, plants were covered with fine-mesh nylon bags prior to flower anthesis. Pollinations were performed by removing the two pollinia from an individual and placing them on the stigmas of a distinct conspecific plant (intraspecific pollination as a control), or of the other species (interspecific pollination) in the two directions. For each individual, less than half flowers were pollinated to avoid the potential negative effects of over-pollination on fruit development. The bags were left in position for the rest of the fruit maturation to prevent predation. Fruit

set was recorded and fruits were collected 3 months after pollination, when capsules reached their maximum size, just before dehiscence.

To determine the percentage of seeds with viable embryos, tetrazolium chloride (TZ) was used. TZ is a suitable stain for species with dormant seeds (ISTA 2006) and has been used efficiently on orchid seed (Shoushtari *et al.* 1994; Vujanovic *et al.* 2000). For each fruit sampled, 5 mg of seeds was pre-conditioned in 1.5 mL tube filled with a 10% (w/v) sucrose solution. After incubation for 24 h at 25°C, solutions were then removed and seeds were washed twice with distilled water. A solution of 1% TZ was added, and the seeds were incubated in the dark at 30°C for 48 h. After the incubation period, TZ solution is replaced with distilled water and 10 µL of seeds suspension are deposited on a glass slide. The percentage of viability was then determined by counting at least 100 seeds under a binocular microscope. Rose and red seeds were counted as viable, while white seeds were counted as non-viable.

4.3.4. Geographic and temporal isolation

The geographic distribution and flowering phenology of *J. rossii* and *J. fragrans* were determined using herbarium specimens and data collected at 121 localities covering the whole range of altitudes in Réunion from the studies of Jacquemyn *et al.* (2005, 2007). Moreover, our field observations were added to the data set. For each species, the potential area of distribution was then determined by grouping all the habitats in which it was observed using habitats defined by Strasberg *et al.* (2005).

4.3.5. Floral morphology and nectar properties

Flowers were sampled from study populations during the flowering season in 2012 (see Table 4.1 for sampling details). In each population, one to four mature flowers were harvested from 13 to 17 randomly sampled individuals (for a total of 75 individuals and 220 flowers), and stored in 70% ethanol (sampling permit code from

the Parc National de la Réunion: DIR/I/2012/002). For each flower, ten traits were measured using a digital calliper (to 0.01 mm): spur length, column height, lip length and width, lateral petal length and width, adaxial sepal length and width, lateral sepal length and width.

In four out of the five studied populations, nectar contained in the spur was sampled from two to eight unvisited flowers from 16 to 23 plants (see Table 4.1). For each flower, nectar volume was measured using calibrated capillary tubes of 5 μ L. Nectar was then placed to a hand refractometer (R5000; Atago USA, Inc., Bellevue, Wash.), from which the sugar concentration was quantified.

Differences in overall morphological traits were investigated using a MANOVA among species (with population as a nested factor) followed by a PCA to describe floral differentiation in a multivariate space. Combination of traits contributing to each principal component was inferred from the magnitude and sign of coefficients associated with each floral trait. Differences in each floral trait among populations were investigated using an ANOVA followed by a Bonferroni corrected pairwise *t*-test. Proportion of variance explained by difference between species and between populations within species was calculated for each floral trait using an nested ANOVA. Statistical analyses were computed using R 2.15.1 (R Development Core Team 2012).

4.3.6. Floral scent

During the flowering season in 2012, we sampled volatiles emitted by 12 individuals of the two species in the field using a dynamic headspace method (see Table 4.1 for sampling details). For each individual, a stem bearing three freshly opened flowers was enclosed in a polyacetate bag (19 x 19 x 24 cm) for 60 min at sunset (1800-1900 h), after which air was pumped from the bag for 60 min at 200 mL/min through a quartz tube (15 mm long; 2 mm diameter) containing a 1:1

mixture of 3 mg Tenax-TA (mesh 60-80; Supelco) and Carbotrap (mesh 20-40; Supelco) using a portable membrane pump (Spectrex PAS-500). Control samples were made repeating the same procedure with a stem bearing no flower on one of the three individuals sampled.

Scent samples were subsequently analysed by direct mass spectrometry (MS) coupled to gas chromatography (GC) using a Varian CP-3800 GC (Varian, Palo Alto, CA, USA) with a Varian 1079 injector equipped with a ‘ChromatoProbe’ thermal desorption device and carbowax column coupled to a Varian 1200 quadrupole mass spectrometer. GC-MS data were processed using MS Workstation 7 Software. Identification of compounds was conducted with the library NIST 02 MS database through a comparison of the retention times with published data (Adams 2001). All compounds present in control samples were excluded from further analyses. The abundance of each other compound was estimated by calculating the GC peak area of that compound, while the total amount of scent in a sample was expressed as the sum of GC peak areas for all compounds found in that sample. A pairwise dissimilarity matrix of Bray-Curtis distance was then calculated between samples. Differences in relative amount of the compounds among species and among populations of *J. rossii* were investigated by non-metric multidimensional scaling (NMDS) on the Bray-Curtis matrix and tested using a one-way ANOSIM. All these analyses were performed with the package ‘vegan’ of R 2.15.1 (R Development Core Team 2012).

4.3.7. Pollinator observations

For three consecutive flowering seasons (between 2010 and 2013), pollinator observations were performed in situ using both hard disk camcorders as in (Micheneau *et al.* 2008c) and the portable digital video surveillance system described by Steen and Aase (2011) with three cameras connected to the recorder. The observations were performed only in populations of Bébou-Takamaka for *J. rossii*

and Mare Longue to *J. fragrans*. For the portable digital video surveillance system, each camera focused on 2-6 fresh flowers (without removal and/or deposition) of the same individual and filmed continuously throughout the lifetime of flowers (about 7-8 days if the flower is not pollinated). Every morning and evening, all filmed flowers were examined for pollen removal and/or deposition. Pollinators were identified from video-captures. For pollinator species identified specimens were sought in the collection of the University of Réunion and the length of their proboscis was measured.

4.4. Results

4.4.1. Genetic differentiation

The 12 nuclear microsatellite loci were polymorphic in all populations sampled, with the exception of locus P1B10 that was fixed in the population of Basse-Vallée for *J. rossi*. Total numbers of alleles per locus ranged between 4 and 24. Overall, 198 alleles were detected and only 15% of them were shared among the species. AMOVA indicated that 29% of the variation was distributed among species ($P = 0.001$), 4% among populations within species ($P = 0.001$), and 67% within populations ($P = 0.001$) (Table 4.2).

Table 4.2. Analysis of molecular variance based on 13 microsatellite loci for populations of *J. rossi* and *J. fragrans*.

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	% Total variance	<i>P</i> value
Among Species	1	346.38	1.70	29%	0.001
Among Populations within species	3	79.56	0.26	4%	0.001
Within Populations	415	1649.17	3.97	67%	0.001

d.f., degrees of freedom

Two genetic clusters could be clearly identified in the PCoA analysis. The first axis, which explained 62.8% of the total genetic variation, segregated the two species. Indeed, all individuals of *J. rossii* are well separated from all individuals of *J. fragrans* (Figure 4.3).

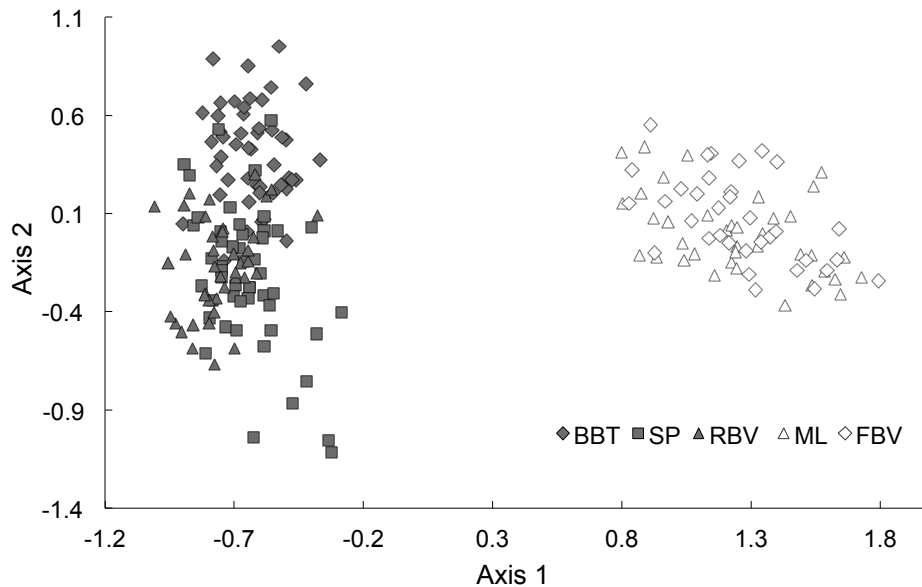


Figure 4.3. Genetic structure of *Jumellea rossii* (filled symbols) and *Jumellea fragrans* (open symbols) inferred from Principal Coordinates Analysis. The first two axes represent 62.8% and 9.3% of the variation, respectively. Each symbol type corresponds to a single population.

4.4.2. Postmating isolation

Prezygotic isolation was assessed using the fruit set resulting from hand-pollinations. In general, bit of the inter- and intraspecies crosses set fruits (Table 4.3). The lowest fruit set was found for interspecies crosses with *J. fragrans* as pollen donor and the highest for intraspecies crosses in *J. rossii*. However, there was no significant different fruit set between inter- and intraspecies crosses (Fisher's exact test, $P = 0.250$).

Table 4.3. Results of hand-pollination experiments to determine postmating isolation between *Jumellea rossii* and *Jumellea fragrans* by fruit set and percentage of viable seeds.

Crossing type	Pollen donor (♂)	Pollen receiver (♀)	N_I	N_C	N_F (%)	Mean percentage of viable seeds \pm s.e.
Interspecies	<i>J. rossii</i>	<i>J. fragrans</i>	5	16	5 (31)	79.7 ± 5.3
	<i>J. fragrans</i>	<i>J. rossii</i>	9	13	3 (23)	25.8 ± 25.8
Intraspecies	<i>J. rossii</i>	<i>J. rossii</i>	15	25	15 (60)	14.0 ± 5.8
	<i>J. fragrans</i>	<i>J. fragrans</i>	19	34	9 (26)	61.2 ± 7.0

N_I , number of individuals ; N_C , number of crosses ; N_F , number of fruits

Postzygotic isolation was estimated using the proportion of viable seeds. The lowest values were obtained for *J. rossii* as pollen receiver both for inter- and intraspecies crosses (Table 4.3). Among all fruits, there was no significant difference between inter- and intraspecies crosses (Wilcoxon rank sum test, $P = 0.078$).

4.4.3. Geographic and temporal isolation

Jumellea fragrans was found exclusively at lower altitudes (< 500 m a.s.l.) along the windward East coast of Réunion, while *J. rossii* was found at higher altitudes (> 600 m a.s.l.) throughout the island (Figure 4.2). No overlap zone was observed between the two species. According to our observations, the lower limit of the range of *J. rossii* was always 100 m above the upper limit of the range of *J. fragrans*.

Floral phenology appeared to be related to the altitude with the highest elevated populations blooming first (BBT and SP in December for *J. rossii*) and the lowest populations blooming between March and April (ML and FBV for *J. fragrans*). However, there was some overlap in the flowering phenology of the two species between the submountain population of *J. rossii* (RBV) and the populations *J. fragrans* (ML and FBV).

4.4.4. Floral morphology and nectar properties

The MANOVA computed on measurements of ten floral traits was highly significant both for species and populations within species ($P < 0.0001$ in both cases). This result indicated that significant morphological differences exist among species and among populations within species that explain respectively 66.2% and 7.8% of the variation measured. This variation was visualized in the PCA of floral traits that discriminated two groups, corresponding to the two species with a slight overlap between them (Figure 4.4).

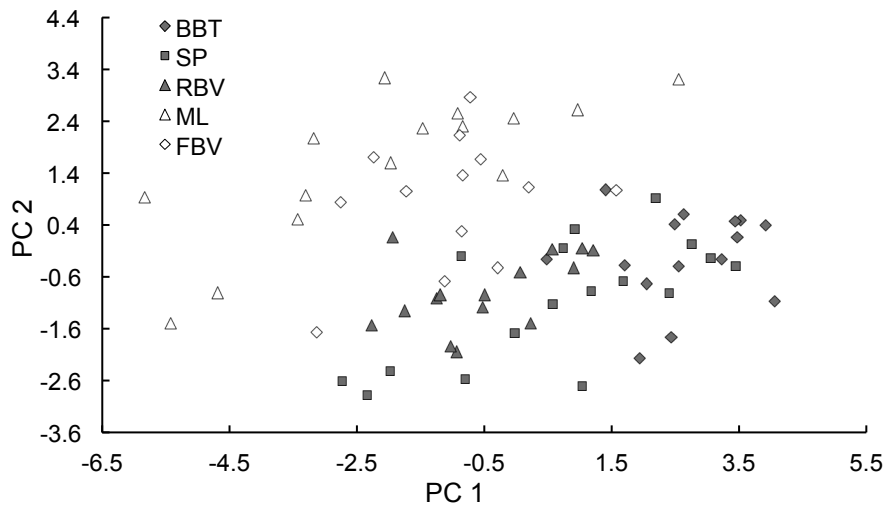


Figure 4.4. Principal component analysis of ten morphological floral traits of *Jumellea rossii* (filled symbols) and *Jumellea fragrans* (open symbols). The first two axes (PC1 & PC2) represent 49.7% and 22.1% of the variation, respectively. Each symbol type corresponds to a single population.

Most traits measured differed significantly between the *J. rossii* and *J. fragrans* but only three characters (spur length, lip width and lateral sepal width) were more variable between species than between populations within species (Table 4.4). Spur length showed a clear bimodal distribution with no overlap between the two species (Figure 4.5). *Jumellea fragrans* had a spur (over two times longer than that of *J. rossii* (respectively 42.3 ± 4.0 mm and 19.9 ± 2.2 mm)).

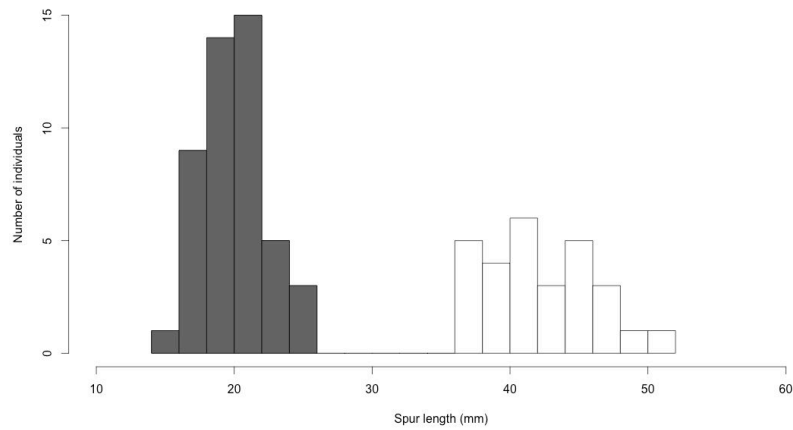


Figure 4.5. Distribution of spur length in *Jumellea rossii* (filled bars; n = 47) and *Jumellea fragrans* (open bars; n = 28).

Table 4.4. Mean, standard deviation of ten morphological measurements and results of ANOVA and nested ANOVA.

Floral trait	<i>Jumellea rossii</i>			<i>Jumellea fragrans</i>		Nested ANOVA	
	BBT N=15	SP N=17	RBV N=15	FBV N=13	ML N=15	Species	Population within species
Spur Length	20.3 ^a ±2.4	20.4 ^a ±2.1	18.9 ^a ±1.9	41.7 ^b ±3.8	42.9 ^b ±4.2	*** 93.2%	NS 0.3%
Column Height	2.6 ^b ±0.9	2.1 ^a ±0.3	2.1 ^a ±0.1	1.7 ^a ±0.5	2.14 ^{ab} ±0.2	* 7.3%	** 18.4%
Lip Width	6.4 ^a ±0.5	6.8 ^a ±0.5	7.7 ^b ±0.5	8.5 ^c ±0.6	9.1 ^c ±0.8	*** 60.1%	*** 15.4%
Lip Length	21.9 ^a ±1.1	23.4 ^{ab} ±1.6	24.4 ^b ±1.2	23.2 ^{ab} ±1.5	22.7 ^a ±2.4	NS 0.8%	*** 21.4%
Lateral Petal Width	3.1 ^a ±0.2	3.2 ^{ab} ±0.2	3.5 ^c ±0.3	3.4 ^{bc} ±0.2	3.6 ^c ±0.3	*** 17.2%	*** 21.5%
Lateral Petal	20.9 ^a ±0.8	23.0 ^b ±2.2	23.2 ^b ±1.2	23.1 ^b ±1.2	23.1 ^b ±2.4	NS 3.0%	** 18.9%
Adaxial Sepal Width	4.6 ^{ab} ±0.3	4.9 ^{bc} ±0.4	4.7 ^{abc} ±0.2	4.5 ^a ±0.4	5.0 ^c ±0.3	NS 0.2%	*** 26.4%
Adaxial Sepal	20.5 ^a ±1.0	22.6 ^b ±2.0	23.2 ^b ±1.0	22.5 ^b ±1.4	23.5 ^b ±2.4	* 4.7%	*** 25.6%
Lateral Sepal Width	3.7 ^a ±0.2	3.7 ^a ±0.3	4.0 ^b ±0.2	4.4 ^c ±0.3	4.7 ^d ±0.3	*** 59.9%	*** 10.0%

Lateral	21.7 ^a ±1.1	23.9 ^b ±2.1	24.2 ^b ±1.1	24.1 ^b ±1.8	24.6 ^b ±2.5	* 6.1%	** 18.4%
Sepal							

All lengths are in mm. Different letters indicate significant differences at $P < 0.05$ after Bonferroni corrected pairwise t-test. * $0.01 \leq P < 0.05$; ** $0.001 \leq P < 0.01$; *** $P < 0.001$

Nectar volume averaged 3.6 ± 2.2 μL per flower ($N = 16$) for *J. fragrans* and differed significantly (permutational t-test, 9999 permutations, $P = 0.0001$) from that of *J. rossii*, which averaged 0.5 ± 0.3 μL ($N = 63$). Concentration of nectar averaged 23.2 ± 4.1 % of sucrose equivalents ($N = 10$) from *J. fragrans* and was not significantly different (permutational t-test, 9999 permutations, $P = 0.061$) from that of *J. rossii*, which averaged 19.7 ± 5.1 % ($N = 26$) of sucrose equivalents.

4.4.5. Floral scent

Non-metric multidimensional scaling analysis showed that there are two discrete groups in scent phenotype space that match to species (Figure 4.6). Moreover, there were highly significant differences in scent composition between the two species (ANOSIM, $R = 0.943$, $P = 0.005$) but no between the populations of *Jumellea rossii* (ANOSIM, $R = 0.078$, $P = 0.292$).

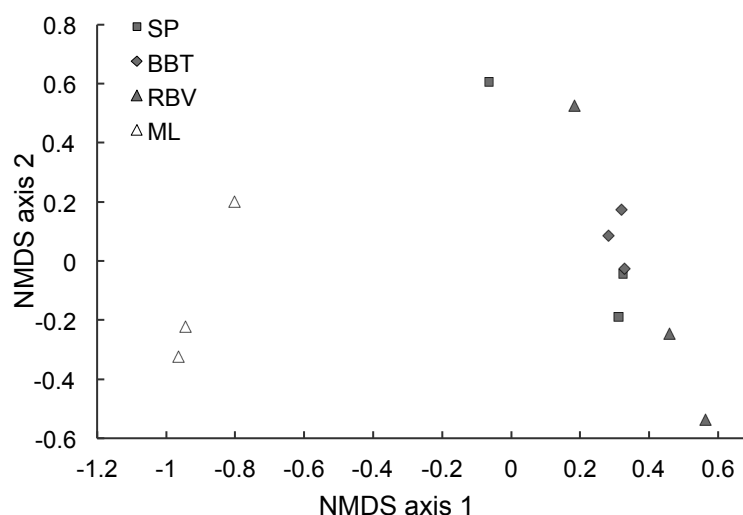


Figure 4.6. Non-metric multidimensional scaling representation of the scent composition of *Jumellea fragrans* (open symbols) and *Jumellea rossii* (filled symbols). Each symbol type corresponds to a single population.

The scent of *J. rossii* is dominated by aromatic benzenoid compounds such as benzaldehyde, benzyl alcohol, benzyl acetate and eugenol. The scent of the *J. fragrans* form is mainly dominated by an oxygenated monoterpene, the linalool that is absent in two populations out of three in *J. rossii*. Other major compounds of *J. fragrans* are aromatic benzenoid compounds such as benzyl alcohol, benzyl acetate and chavicol. The list of all compounds identified in each population is given in the Table 4.5.

Table 4.5. Mean relative amounts [min-max] of the volatile compounds identified in the floral scent emitted at dusk in populations of *J. rossii* and *J. fragrans*. *R*_f: Kovat's retention index. *tr*: mean relative amount < 0.1.

Compound	R_t	<i>J. rossii</i>				<i>J. fragrans</i>			
		RBV ($N=3$)		BBT ($N=3$)		SP ($N=3$)		ML ($N=3$)	
Aliphatics (alcohols)									
(Z)-3-Hexenol	1367	-		-		-		0.1	[0.1-0.2]
2-Ethylhexanol	1469	0.2	[0.1-0.3]	0.1	[0.0-0.3]	0.1	[0.0-0.1]	0.2	[0.1-0.5]
Σ		0.2		0.1		0.1		0.3	
Isoprenoids									
Monoterpene hydrocarbons									
Limonene	1230	0.3	[0.2-0.4]	1.7	[0.3-4.5]	0.2	[0.0-0.3]	-	
Oxygenated monoterpenes									
(E)-Linalool oxide (furanoid)	1456	0.1	[0.1-0.3]	0.3	[0.2-0.4]	0.2	[0.1-0.3]	0.5	[0.4-0.6]
Linalool	1531	-		-		2.4	[1.0-4.8]	44.5	[23.6-59.0]
Linalool oxide (pyranoid)	1766	-		-				0.1	[0.0-0.1]
Geraniol	1858	-		-				tr	
2,6 Dimethyl-3,7-octadien-2,6-diol	1967	-		-				0.1	[0.0-0.1]
Sesquiterpene hydrocarbons									
α -Bergamotene	1574	0.1	[0.0-0.1]	tr		-		tr	
Unknown m/z: 161,105,119,91	1694	-		-		-		1.0	[0.9-1.1]
Oxygenated sesuiterpenes									
(E)-Nerolidol	2055	-		0.1	[0.0-0.1]	tr		tr	
Diterpenes									
Geranyl linalool	2522	tr		tr		tr		-	
Σ		0.5		2.1		2.8		46.2	
Benzenoids and phenyl propanoids									
Benzaldehyde	1522	60.3	[24.1-87.0]	47.4	[42.5-54.8]	44.9	[16.0-61.8]	1.1	[0.0-2.5]
Methyl benzoate	1620	tr		tr		tr		3.6	[2.9-4.4]
Methyl chavicol	1652	-		-		-		tr	
Benzyl formate	1691	0.2	[0.1-0.5]	0.1	[0.1-0.2]	0.2	[0.0-0.3]	0.1	[0.1-0.1]
Benzyl acetate	1743	16.0	[3.9-32.2]	22.0	[18.5-23.8]	26.6	[12.3-45.5]	16.5	[13.8-21.3]
Methyl salicylate	1777	tr		-		-		0.1	[0.0-0.2]
Benzyl alcohol	1897	10.2	[6.3-14.5]	20.3	[17.1-25.9]	20.5	[16.6-27.5]	15.5	[14.4-16.3]
Phenol	2037	-		tr		tr		-	
Methyl eugenol	2045	tr		-		-		tr	
Unknown m/z:91,117,108,118	2085	tr		tr		tr		-	
Unknown m/z:131,77,108,132	2091	tr		tr		tr		0.1	[0.0-0.1]
p-Cresol	2129	0.2	[0.1-0.4]	tr		tr		0.2	[0.2-0.2]
Benzyl tiglate	2154	tr		-		-		tr	
(E)-Cinnamyl acetate	2197	0.1	[0.0-0.1]	tr		tr		0.2	[0.1-0.4]
Eugenol	2205	11.2	[1.5-24.9]	7.4	[3.0-15.2]	4.7	[1.7-8.9]	2.5	[1.3-4.4]
(Z)-Isoeugenol	2309	tr		tr		tr		-	
(E)-Cinnamic alcohol	2333	tr		-		-		1.0	[0.1-1.7]
Chavicol	2380	0.4	[0.1-0.9]	0.2	[0.2-0.3]	0.1	[0.0-0.2]	11.9	[3.7-23.4]
(E)-Isoeugenol	2393	0.1	[0.0-0.2]	tr		tr		-	
Coumarin	2508	0.1	[0.0-0.1]	tr		tr		0.1	[0.1-0.2]
Vanilin	2594	0.2	[0.0-0.4]	tr		tr		tr	
Benzyl benzoate	2645	0.3	[0.1-0.6]	tr		tr		0.1	[0.0-0.2]
Benzyl salicilate	2803	tr	tr	-		-		0.1	[0.0-0.3]
Σ		99.3		97.4		97.0		53.1	
Nitrogen-containing compounds									
Methyl nicotinate	1799	-		-		-		0.3	[0.2-0.5]
Indole	2489	-		-		-		tr	
Σ		-		-		-		0.3	
Total		100.0		99.6		99.9		99.9	

4.4.6. Pollinator observations

In total, flowers were observed *in situ* for 786 h 23 min (321 h 18 min for *J. rossii* and 465 h 05 min for *J. fragrans*). On three seasons of observations, only nine pollination events were recorded (Table 4.6). Observations revealed that pollination events occurred only from sunset to sunrise for both species. Two moths (*Ctenoplusia etiennei* and *Chrysodeixis chalcites*; Noctuidae) and one hawkmoth (*Macroglossum milvus*, Sphingidae) were recorded visiting *J. rossii*. Only one species of hawkmoth (*Agrius convolvuli*, Sphingidae) was filmed for *J. fragrans*. All these species were observed as effective pollinator that is leading to the removal and / or deposition of pollinia. For all pollination events, insect visited most filmed flowers and could return several times on the same flower (up to four times for hawkmoths).

Table 4.6. Details of video sessions for each species, each flowering season and each camera system.

Species	Flowering season	Camera system*	Observation time	N_P	Pollinator identity
<i>Jumellea rossii</i>	2010/11	HDC	58:42:00	0	-
	2011/12	HDC	45:00:00	3	<i>Chrysodeixis chalcites</i> ^a (2005; 2013; 2036)
	2011/12	DVS	217:36:00	6	<i>Macroglossum milvus</i> ^b (0630), <i>Ctenoplusia etiennei</i> ^c (0238; 2013; 2119), <i>Chrysodeixis chalcites</i> ^a (2038; 2310)
<i>Jumellea fragrans</i>	2010/11	HDC	13:09:00	0	-
	2011/12	DVS	358:54:00	0	-
	2012/13	HDC	07:20:00	0	-
	2012/13	DVS	85:42:00	2	<i>Agrius convolvuli</i> ^d (0630; 1904)

N_P : number of pollination events (i.e. at least one flower with removed or deposited pollinia after a visit) observed after a session.

*HDC: Hard Disk Camcorders as in Micheneau *et al.* (2008b); DVS: Digital Video Surveillance system as in Steen & Aase (2011).

Tongue length in mm: ^a17.0 (photographic determination); ^b28.0 ($N=1$); ^c13.2 \pm 0.3 ($N=3$); ^d89.2 \pm 12.9 ($N=9$).

4.5. Discussion

4.5.1. Effective reproductive isolation without apparent postmating isolation

Our results showed that the microsatellites used in this study appear to be useful markers for discriminating individuals of *J. rossii* and *J. fragrans*. Indeed, molecular data revealed a clear match between taxonomic identity and genetic composition of all sampled individuals with a majority of alleles being species specific. Moreover, the principal coordinate analysis indicated that there was no hybrid among sampled individuals. These results indicate that there would be no gene flow between the two species, even among the geographically closer populations. In plants, interspecific gene flow can be avoided or restricted by different reproductive barriers and total reproductive isolation among most plant species pairs is often the result of several pre- and postpollinating barriers (Rieseberg & Willis 2007). In this study, interspecific crosses do not produce less fruits than intraspecific crosses and these fruits do not contain less viable seeds. Postmating isolation is therefore probably absent between *J. rossii* and *J. fragrans*. However, this result should be considered with caution because of the small number of crosses made because of the low number of crosses made especially because only the early stages of F₁ hybrids were observed. To confirm the absence of postmating barriers, it should be verified that the F₁ hybrids are as viable and fertile as the parent species and that they can produce F₂ hybrids. Usually, postmating barriers arise between flowering plant species as a by-product of evolutionary divergence, after the formation of premating barriers (Levin 1978; Grant 1981). Moreover, oceanic island species are typically cross compatible and interfertile even between species from different genera (Stuessy & Ono 1998). In recently radiated taxa, hybrid formation is thus frequently observed (Humeau et al. 1999; Brochmann et al. 2000; Howarth and Baum 2005). In our system, the absence

of hybrid thus suggests a predominant role of premating barriers in total effective reproductive isolation.

4.5.2. Geographical and temporal isolation

This study revealed that *J. rossii* and *J. fragrans* were clearly divergent along an environmental gradient determined by elevation. The first species were found in the mid-altitude and mountain forests and the second in the lowland forests. In addition, on all sites surveyed, these species have never been observed in sympatry. Theoretically, geographical isolation can be sufficient to cause speciation (Kisel & Barraclough 2010). However, given the dispersal capabilities orchids seeds (Arditti & Ghani 2000), *J. rossii* and *J. fragrans* from Basse-Vallée (RBV and FBV) are probably not geographically isolated enough (2 km) to prevent gene flow via seed dispersal. Nevertheless, the current distribution of these two species on the island may not reflect the distribution during their divergence. The high volcanic activity of both volcanoes (Piton des Neiges and Piton de la Fournaise) in Réunion at different times over the last 500,000 years (Salvany *et al.* 2012) may have resulted in strong spatial isolation of small patches of forests. It is unlikely that geographical isolation alone explain the absence of current gene flow between the two species. Indeed, net and abrupt separation between the ranges of the two species and the absence of hybrid individuals in this transition region (from FBV to RBV) suggests that a mechanism strongly prevents migration between these populations. Pollen dispersal would be limited by variation in the flowering phenology between the two species. However, this may not explain the total absence of hybridization because the end of the flowering time of *J. rossii* in RBV overlaps the beginning of that of *J. fragrans* in FBV.

4.5.3. Floral isolation

Plant-pollinator interaction can play a major role in the reproductive isolation of orchid species by floral isolation. Indeed, the interaction of pollinator behaviour and morphology with floral characters may form a reproductive barrier when pollen transfer is exclusively assortative (Schiestl & Schlüter 2009). The results of this study are consistent with the expectations stated by the hypothesis that floral divergence between *J. rossii* and *J. fragrans* was driven by a pollinator shift. Indeed, our analyses showed that the two species differ for floral morphology and floral scent together with a difference in pollinator species. These results suggest that difference in floral traits may reflect adaptation to the different observed pollinators.

Morphological and floral scent data clearly show the existence of two distinct groups that correspond to the two different species. The first group representing *J. rossii* is characterized by short-spurred flowers (< 3 cm) that emit predominantly benzaldehyde, benzyl acetate, benzyl alcohol and eugenol which correspond to the phalaenophilous syndrome (Knudsen & Tollsten 1993; Huber *et al.* 2005). The second group representing *J. fragrans* is characterized by long-spurred flowers (> 3 cm) that emit predominantly linalool, benzyl acetate, benzyl alcohol and chavicol which correspond to the sphingophilous syndrome (Knudsen & Tollsten 1993; Raguso & Light 1998). In addition, our results reveal that pollinators of each species are consistent with their pollination syndrome. Indeed, the majority of pollinators observed in *J. rossii* are Noctuidae while the only pollinator observed in *J. fragrans* is a Sphingidae. As floral scent plays a major role in pollinator attraction and spur length determines the functional fit between plant and pollinator, these traits can thus be subject to selection particularly for night-blooming flowers (Raguso *et al.* 2003) and food-rewarding species (Nilsson 1983, 1988). The pollinator shift between *J. rossii* and *J. fragrans* may thus be the result of adaptation to the different pollinator groups. However, the role of pollinator-mediated selection in driving floral divergence remains to be tested between these two sister species. Measure of

reproductive success in reciprocal translocation experiments could address this issue. Moreover, the evolutionary process and the ecological conditions by which this shift occurs are unresolved. Data on distribution of these pollinators are still lacking in Réunion to infer a geographical gradient of pollinator availability which could be used to test the Grant-Stebbins model assumption (Johnson 2006). However, the endemic *Ctenopplusia etiennei*, pollinator of *J. rossii*, is found exclusively in submountain and mountain rainforest where it is frequent and that corresponds to the range of *J. rossii* (Guillermet, unpublished data). It should be noted that other factors than pollinator distribution might determine divergent selection between habitats such as difference in plant community composition (van der Niet *et al.* 2014). In such case, competition with other plant species for pollinator resource may result in difference of pollinator availability between habitats which may finally lead to pollinator shift.

4.5.4. A possible case of pollinator-mediated ecological speciation

According to Nosil (2012), ecological speciation is “*the process by which barriers to gene flow evolve between populations as a result of ecologically based divergent selection between environments*”. In our system, divergent ecological selection may have occurred as a consequence of the interaction of individuals with their pollinators. Indeed, spur length and floral scent, which are expected to be under strong selection by pollinators, are significantly different between *J. rossii* and *J. fragrans* and appear to be adapted to the effective pollinators of each species. Moreover, these divergent floral traits may have contributed directly to non-random mating and finally to the evolution of premating isolation through the attraction of different pollinator species. This study therefore reveals a probable case of pollinator-mediated ecological speciation but to confirm, experimental evidence of selection on floral traits and scent choice preference by pollinators are needed (van der Niet *et al.* 2014).

Ecological speciation often occur along multiple ecological gradients with multiple form of selection leading to different reproductive barriers (Nosil 2012). Geographic and temporal isolation between *J. rossii* and *J. fragrans* could thus be the result of divergent selection thus contributing to the divergence of these species. For instance, geographical isolation between these species could be to the interaction with mycorrhizal fungi. Indeed, seed dispersal of epiphytic orchids might likely occur continuously across Réunion. Nevertheless, suitable mycorrhizal fungi are required for orchid germination and seedling establishment (Ackerman *et al.* 1996; Rasmussen 2002) and mycorrhizal specificity may constrain the ecological and/or geographical range of orchids (Otero *et al.* 2004). The larger ecological and geographical range of *J. rossii* compared to *J. fragrans* is thus consistent with the results of Martos *et al.* (2012). Indeed, they have shown that *J. rossii* is associated with eight clades of fungi including four Tulasnellaceae, two Ceratobasidiaceae and two Sebaciniales whereas *J. fragrans* is associated with only one clade of Sebaciniales (also found in a single sample of *J. rossii*). Moreover, natural selection may favour individuals that make more effective use of mycorrhizal fungi (Otero *et al.* 2005). It is thus possible that *J. rossii* and *J. fragrans* are locally adapted to different mycorrhizal communities according to their different habitat. In this case, local adaptation to different mycorrhizal fungi would have a role in maintaining the species integrity by selection against migrants as described in Nosil *et al.* (2005).

4.5.5. Conclusion

In this study, five different kinds of reproductive barriers were quantified between two sister species of *Jumellea* using a multidisciplinary approach. Among these potential barriers, prepollination barriers such as geographic, temporal and floral isolation were found to be very important in maintaining reproductive isolation, whereas early postpollination barriers were effectively absent in our study species. Moreover, population genetic analysis revealed a clear separation between species

with no hybrids detected among collected samples. These results suggest a strong role of plant–pollinator interactions in the evolution of reproductive isolation and plant speciation thus providing a putative case of ecological speciation.

4.6. Acknowledgements

We thank Ali M'Dere and Sylvain Guichard for field assistance, Christian Guillermet for pollinator identification and the free use of his observation data, Prof S.D. Johnson for having free of charge lent all the equipment for floral scent analyses. We also thank Office National des Forêts for logistic support in Bébou and Parc National de la Réunion for permission to collect material of *J. rossii* and *J. fragrans* (sampling permit code: DIR/I/ 2012/002). Logistic support for fieldwork in Basse-Vallée and Mare-Longue was provided by Mare-Longue research station, at Saint-Philippe, (Feder Réunion 2.02). This work was support by the Conseil Général de la Réunion and by the University of Réunion.

5 Evidence for isolation-by-habitat among populations of an epiphytic orchid species on a small oceanic island

Bertrand Mallet¹, Florent Martos², Laury Blambert¹, Thierry Pailler¹ & Laurence Humeau¹.

¹*UMR Peuplements Végétaux et Bio-agresseurs en Milieu Tropical, Université de la Réunion, Ile de la Réunion, France.*

²*School of Life Sciences, University of KwaZulu-Natal, Pietermaritzburg, South Africa.*

Publiés dans *Plos One* 9(2): e87469, 2014

Keywords: Isolation-by-ecology, isolation-by-distance, population divergence, gene flow, microsatellites, phenotypic variation, Orchidaceae

5.1. Présentation de l'article

5.1.1. Résumé

L'identification des facteurs qui favorisent la divergence des populations est cruciale pour la compréhension des premiers stades de la spéciation. De manière générale, les flux de gènes entre les populations vivant dans des environnements différents peuvent être réduits par la distance géographique (isolement par la distance) ou par sélection divergente résultant de l'adaptation locale (isolement par l'écologie). Peu d'études ont étudié l'influence relative de ces facteurs dans la différenciation des populations des îles océaniques hautes où l'on s'attend à une faible influence de la distance géographique et une forte influence de l'adaptation locale résultant de la diversité d'habitats. Cette problématique a été abordée chez *Jumellea rossii*, une orchidée épiphyte endémique de la Réunion. Plus précisément, la différenciation spatiale des phénotypes adaptatifs (morphologie florale et parfum floral) et des génotypes neutres (microsatellites nucléaires) a été mesurée entre dix populations issues de trois types d'habitats différents. Les résultats indiquent une différenciation génétique significative principalement déterminée par les distances environnementales entre les populations et une structuration selon le type d'habitat. Ces résultats suggèrent que des facteurs écologiques pourraient réduire le flux de gènes entre les populations situées dans des habitats différents. Ce patron d'isolement par l'habitat pourrait être dû aux effets combinés de la sélection contre les migrants (isolement par l'écologie) du décalage de la phénologie florale entre habitats. En outre, les données de morphologie florale présentent le même patron de différenciation et sont en accord avec ces conclusions bien que cette puisse en partie refléter de la plasticité phénotypique. L'absence de différenciation du parfum floral entre les populations indiquerait que la relation plante-pollinisateur joue pas un rôle majeur dans la différenciation de la population de *J. rossii*. En conclusion, les résultats de

cette étude soulignent l'importance de la diversité d'habitats des petites îles océaniques dans la divergence des populations.

5.1.2. Abstract

Identifying factors that promote population differentiation is of interest for understanding the early stages of speciation. Gene flow among populations inhabiting different environments can be reduced by geographical distance (isolation-by-distance) or by divergent selection resulting from local adaptation (isolation-by-ecology). Few studies have investigated the influence of these factors in small oceanic islands where the influence of geographic distance is expected to be null but where habitat diversity could have a strong effect on population differentiation. In this study, we tested for the spatial divergence of phenotypes (floral morphology and floral scent) and genotypes (microsatellites) among ten populations of *Jumellea rossii*, an epiphytic orchid endemic to Réunion growing in three different habitats. We found a significant genetic differentiation between populations that is structured by habitat heterogeneity rather than by geographic distance between populations. These results suggest that ecological factors might reduce gene flow among populations located in different habitats. This pattern of isolation-by-habitat may be the result of both isolation-by-ecology by habitat filtering and asynchrony in flowering phenology. Furthermore, data on floral morphology match these findings, with multivariate analysis grouping populations by habitat type but could be only due to phenotypic plasticity. Indeed floral scent compounds were not significantly different between populations indicating that specific plant-pollinator mutualism does not seem to play a major role in the population differentiation of *J. rossii*. In conclusion, the results from our study emphasize the importance of habitat diversity of small oceanic islands as a factor of population differentiation.

5.2. Introduction

Genetic differentiation among populations of a species can be the result of limited gene flow and genetic drift followed by divergent natural selection acting on these different gene pools (Wright 1931, 1943; Hutchison & Templeton 1999). On the contrary, a strong disruptive selection can initiate divergence among populations through local adaptation, which finally reduce gene flow by selection against migrants or assortative mating (Shafer & Wolf 2013; Orsini *et al.* 2013). In this situation, drift can increase population divergence by causing linkage disequilibrium between selected and reproductive traits (Servedio & Noor 2003). Population differentiation is therefore an evolutionary split combining neutral and non-neutral processes; however, their relative significance is not in general agreement in the literature (Schluter 2001; Sobel *et al.* 2010).

So far, population differentiation has been mainly studied in a geographical context in which initial divergence between populations depends on the level of migration between them (Wright 1943, 1946; Hutchison & Templeton 1999). Dispersal probability is expected to decrease with distance so that gene flow is generally lower between geographically distant populations causing a pattern of isolation-by-distance (IBD, Wright 1943). Besides IBD, geographically close populations may also diverge because of the great ecological contrast among them; in this case, the level of gene flow would decrease between populations in different environments causing a pattern of isolation-by-ecology (IBE, we always use this generic term as defined in Shafer & Wolf 2013). A correlation between genetic divergence and geographical distance is expected under IBD, whereas a correlation between genetic divergence and environmental dissimilarity is expected under IBE. However, geographical and environmental factors are not exclusive and can act together to reduce gene flow between populations (Lee & Mitchell-Olds 2011; Surget-Groba *et al.* 2012; Wang 2013).

Species exclusively found on small oceanic islands are excellent systems to study ecological isolation because geographical distances between populations are a priori less important on a small oceanic island than on the mainland. Moreover young oceanic islands are topographically complex and, as a result, a wide range of climatic and ecological conditions is found at small geographic scale (Whittaker *et al.* 2008). For instance, Milá *et al.* (2010) showed a strong morphological and genetic differentiation among populations of a passerine bird in the Mascarene archipelago, which occurred along an altitudinal gradient of habitat types principally, despite short geographic distances separating them. This case study suggests that isolation-by-ecology may be an important driver for intra-island population differentiation, although this needs be further investigated in other organisms.

Orchids are particularly interesting in this context because they produce numerous minute seeds capable of long-range dispersal (Arditti & Ghani 2000) and are thus generally well represented on remote oceanic islands. Even though intra-island migrations might occur continuously, suitable mycorrhizal fungi are nevertheless required for orchid germination and seedling establishment, as well as suitable pollinators population maintenance (Ackerman *et al.* 1996; Rasmussen 2002). Moreover, orchids usually have small effective population sizes, which may stress the effect of genetic drift (Ackerman & Zimmerman 1994; Tremblay *et al.* 2005). However, Phillips, Dixon and Peakall (Phillips *et al.* 2012) showed that this family tends to exhibit low levels of population differentiation, especially at small spatial scale, and suggested that drift might not play a major role in orchid population differentiation and speciation. Nevertheless, they pointed out that very few studies have been conducted in tropical epiphytic orchids and consequently emphasized the need for future research on these groups.

Here, we focus on the genetic differentiation among populations of an epiphytic orchid species, *Jumellea rossii*, which is endemic to Réunion and widespread across several habitat types on this island (Jacquemyn *et al.* 2007b). Moreover, given that

this species shows some obvious phenotypic variation across its range (Mallet *et al.* 2012), we also investigate the population differentiation for some phenotypic traits (i.e. floral morphology and scent chemistry). The aim of this study is to assess the relative significance of geographic and environmental distances in isolating populations of *J. rossii* in Réunion.

5.3. Materials and methods

5.3.1. Study area and species

Réunion (55°39'E; 21°00'S) is a small (2512 km²) and young (about two million years) oceanic island in the Mascarene archipelago. Two volcanic massifs shape the island; one of them is still active (Piton de la Fournaise; Figure 5.1), which confers to Réunion a complex topography and a resulting strong variation in rainfall from east (wet) to west (dry) and in temperature along the altitudinal gradient. As a result, Réunion is ecologically heterogeneous and has got about 20 well-distinct habitat types despite its small surface area (Strasberg *et al.* 2005). Orchids represent approximately 20% of the native vascular flora, and species composition, breeding systems and floral traits vary along the altitudinal gradient principally (Jacquemyn *et al.* 2005).

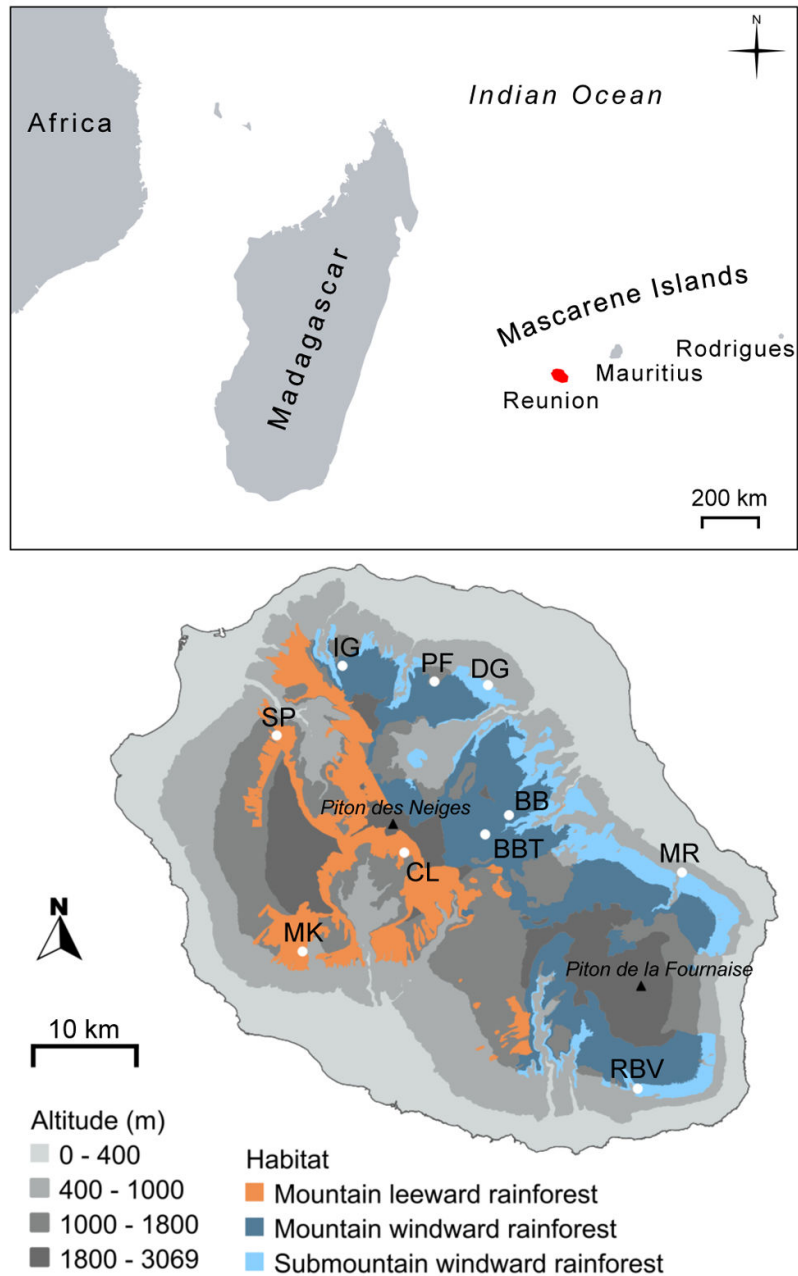


Figure 5.1. Location of Réunion and study populations. The top map shows the location of Réunion (in red) in the southwest Indian Ocean. The bottom map shows the location of study populations and the distribution of the three natural habitat types of *Jumellea rossii*.

Jumellea rossii Senghas is a long-lived perennial orchid that is exclusively found in the wetter forests of Réunion between 500 and 1800 m a.s.l. Populations grow epiphytically in three main habitat types: mountain windward rainforest (MWR), mountain leeward rainforest (MLR), and submountain windward rainforest (SWR; Table 5.1, Figure 5.1). Autonomous self-pollination is unlikely, but *J. rossii* is self-

compatible and geitonogamous pollination seems to be frequent in this orchid that rewards moth pollinators with a copious amount of nectar contained in a long spur (Mallet, unpublished data). Pollinators include at least one Sphingidae and two Noctuidae species (Mallet, unpublished data). Plants form dense clumps of 20-50 cm high stems, each stem producing one to five flowers, white in colour, and each flower emitting a pleasant, sweet fragrance at dusk. The flowering period is between December and March during the rainy season, and variation in floral phenology remarkably correlates with altitude: highland populations flower earlier than lowland populations. A molecular phylogeny of the genus *Jumellea* (Rakotoarivelo *et al.* 2012) showed that within-island speciation events occurred in Réunion for several lineages including *J. rossii*.

Table 5.1. Characteristics of the studied populations of *Jumellea rossii* in Réunion.

Population	Code	Longitude	Latitude	Altitude	N_m	N_g	N_c
Mountain Windward Rainforest	MWR				40	173	3
Plaine des Fougères	PF	55°31'04"E	20°58'29"S	1220 m	14	23	-
Bébour	BB	55°35'23"E	21°05'52"S	1140 m	11	50	-
Bébour-Takamaka	BBT	55°33'53"E	21°06'32"S	1370 m	15	48	3
Ilet à Guillaume	IG	55°25'01"E	20°57'38"S	1200 m	-	52	-
Mountain Leeward Rainforest	MLR				42	124	5
Cilaos	CL	55°29'21"E	21°07'27"S	1400 m	25	40	3
Saint-Paul	SP	55°22'26"E	21°01'14"S	1390 m	17	50	2
Les Makes	MK	55°23'36"E	21°12'35"S	1120 m	-	34	-
Submountain Windward Rainforest	SWR				51	113	8
Mourouvain	MR	55°44'52"E	21°08'37"S	550 m	16	21	2
Dugain	DG	55°34'07"E	20°58'42"S	770 m	20	52	3
Basse-Vallée	RBV	55°42'16"E	21°19'30"S	850 m	15	40	3

N_m , N_g , N_c number of sampled individuals for morphometric, genetic and aromatic chemical analyses respectively.

5.3.2. Genotyping

Three to four populations of *J. rossii* per habitat type were sampled between January and July 2012 in Réunion (sampling permit code from the Parc National de la Réunion: DIR/I/2012/002); that is, a total of ten populations and 410 plant individuals (see Table 5.1 and Figure 5.1 for sampling sizes and distribution of populations respectively). For each plant, leaf material was desiccated in the field with silica gel, and DNA was later extracted using a DNeasy® Plant mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). Individuals were genotyped for 13 polymorphic microsatellite loci—namely P2G7, P1A9, P2E3, P2H10, P2G6, P2G11, P2G2, P2E12, P2D1, P1B10, P2E2, P2G4 (Humeau *et al.* 2010), plus a new locus P2G8 (F: 5'-CAGCCGAGAGAGTGTGTGAG-3', R: 5'-GACCATGCTGTCGGAATTTT-3') designed during this study. PCR multiplexes with fluorescently labelled primers were performed as in (Humeau *et al.* 2010). PCR fragments were resolved by capillary electrophoresis on an automated sequencer ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Allele sizes were determined using Genemapper analysis software (Applied Biosystems).

5.3.3. Genetic diversity

All pairs of loci were tested for linkage disequilibrium using a probability test in Genepop 4.0 (Rousset 2008). Critical significance levels for multiple testing were corrected applying a sequential Bonferroni correction. FreeNA (Chapuis & Estoup 2007) was used to estimate null allele frequencies, for each locus in each population, according to the expectation maximization (EM) algorithm of Dempster *et al.* (1977). The mean observed number of alleles per locus (A_L) and the number of private alleles (A_P) per population were computed using GenAlEx 6.5 (Peakall & Smouse 2006, 2012). Allelic richness (A_R , El Mousadik & Petit 1996), as implemented in the software FSTAT 2.9.3 (Goudet 2001), was used to make direct comparisons of the

mean number of alleles among populations regardless of sample size. Expected heterozygosity (H_E) over all loci, observed heterozygosity over all loci (H_O), multilocus F_{IS} estimated through the fixation index of Weir & Cockerham (1984) were calculated using Genepop 4.0 (Rousset 2008). The exact tests of Guo & Thompson (1992) based on Markov chain iteration were used to test for departures from Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE). To test for differences in amount of genetic variability (A_R and H_E) between habitats, a test of comparison among groups of populations using FSTAT 2.9.3 (Goudet 2001) was performed with 9999 permutations.

5.3.4. Genetic differentiation

Analysis of molecular variance (AMOVA; Excoffier *et al.* 1992) was performed using GenAlEx 6.5 to determine the relative partitioning of total genetic variation among habitat types, among populations of a same habitat, and within populations. The multilocus fixation index (F_{ST}) was computed among pairs of populations as in Weir & Cockerham (1984), and statistical significance was tested by 1000 random permutations of genotypes among populations using Genepop 4.0. To evaluate whether stepwise mutations contribute to the genetic differentiation between populations or between habitat types, a test developed in Hardy *et al.* (2003) was performed from the microsatellite data. Based on a randomization of allele sizes among allelic states (1000 permutations), this test computes an R_{ST} (an analogue of F_{ST} based on allele size rather than allele identity; Slatkin 1995) among populations, and can be interpreted as testing whether $F_{ST} = R_{ST}$. To compare our results on genetic differentiation in *J. rossii* with other allozyme-based population studies in orchids (Phillips *et al.* 2012), Hedrick's G'_{ST} (Hedrick 2005)—a standardized estimator of population genetic differentiation—was calculated using GenAlEx 6.5 (Peakall & Smouse 2006, 2012). This estimator is particularly well suited for highly polymorphic microsatellites for which F_{ST} is, by definition, inferior to the average within-population homozygosity, even when no alleles are in common between

subpopulations (Hedrick 2005). To overcome this problem, G'_{ST} is defined in order to have the same range, 0-1, for all levels of genetic variation. To determine if genetic drift occurs in the population differentiation of *J. rossii*, the effective population size (N_e) of each population and migration rates between populations were estimated. N_e of each population was estimated using a single-sample method (as opposed to temporal methods that require at least two data sets from the same population). LDNE software (Waples & Do 2008) was used to calculate N_e from linkage disequilibrium in the data set. For this analysis, random mating was assumed, and all alleles with frequencies lower than 0.05 were excluded from the analyses. To estimate recent migration rates among populations and to identify which factor (geographic or environmental distances) affect migration among populations, a Bayesian method based on microsatellite multilocus genotypes was applied, as implemented in BIMr (Faubet & Gaggiotti 2008). This software uses Bayesian assignment to infer the proportion of recent immigrants in a population from their genotypes and calculates corresponding asymmetrical migration rates between pairs of populations. Then, migration rates were related to factors in a generalized linear model. Five runs of MCMC were carried out and the obtained migration rates correspond to the average of the five runs. For each run, 5,040,000 iterations were used. The first 20,000 iterations consisted of short pilot runs used to tune up the proposal distributions to obtain reliable acceptance rates. The next 20,000 iterations were discarded as burn-in and the remaining observations were sampled every 50 iterations, giving a sample size of 100,000 for each analysis.

5.3.5. Genetic structure

Assignment of multi-locus genotypes to different clusters was examined using two methods. Following a Bayesian clustering method, we ran InStruct (Gao *et al.* 2007) for $K = 1$ to $K = 12$ genetic clusters in mode 4 in order to infer the genetic structure and inbreeding coefficients. Whereas Structure (Pritchard *et al.* 2000) minimizes

deviations from HWE within an inferred population, InStruct considers inbreeding or selfing rate in the model. For each value of K, InStruct was run with ten independent chains, each chain being run along one million iterations with a burn-in of half a million and a thinning interval of ten steps. To determine the optimal K, mean log-likelihood of the data (Pritchard *et al.* 2000) and ΔK (Evanno *et al.* 2005) were plotted for each K. An alternative method, implemented in the adegenet package 1.3-4 (Jombart 2008) for R 2.15.1 (R Development Core Team 2012), using K-means clustering of principal components for $K = 1$ to $K = 39$ and Bayesian Information Criteria was performed to assess the best number of genetic cluster. The two dissimilar approaches were used in this study, because different clustering approaches may lead to different conclusions (Waples & Gaggiotti 2006; Frantz *et al.* 2009). In order to test whether the genetic differentiation is structured by habitats, population structure was also explored by performing Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC; Jombart *et al.* 2010) with habitats as grouping factor. DAPC analysis is a recent multivariate approach that does not make any assumption about HWE or linkage equilibrium. DAPC transforms genotypes using PCA as a prior step to a discriminant analysis. The latter is performed to a number of principal components retained by the user (60 representing 84% of total genetic variation in this study) in order to maximize the among-population variation and minimize the variation within predefined groups (Jombart *et al.* 2010); that is, habitat types in the present case. DAPC was applied using the adegenet package 1.3-4 (Jombart 2008) for R 2.15.1 (R Development Core Team 2012).

5.3.6. Differentiation in floral morphology

Flowers were sampled from eight out of the ten populations under study during the flowering season in 2012 (see Table 5.1 for sampling details). In each population, one to four mature flowers were harvested from 11 to 25 randomly sampled individuals for a total of 133 individuals and 326 flowers, and stored in 70% ethanol

(sampling permit code from the Parc National de la Réunion: DIR/I/2012/002). For each flower, ten traits were measured using a digital calliper (to 0.01 mm): spur length, column height, lip length and width, lateral petal length and width, adaxial sepal length and width, lateral sepal length and width. Differences in each floral trait among habitat types (with population as a nested factor) were investigated using an ANOVA followed by a Bonferroni corrected pairwise t-test. Differences in overall floral traits among habitat types (with population as a nested factor) were investigated using a MANOVA followed by a Canonical Discriminant Analysis (CDA) to describe morphological differentiation among habitat types in a multivariate space. This method maximizes the separation between pre-defined groups (i.e. habitat types in this case), and identifies the most explaining variables that separate the group centroids. Combination of traits contributing to each canonical variate was inferred from the magnitude and sign of structure coefficients associated with each floral trait. These statistical analyses were computed using R 2.15.1 (R Development Core Team 2012).

5.3.7. Differentiation in floral scent

Volatiles emitted by flowers were sampled from six out of the ten studied populations during the flowering season in 2012, from a total of 16 individuals (see Table 5.1 for sampling details). In the field, we selected intact plants and flowers and sampled their volatiles using a dynamic headspace method. A stem bearing three freshly opened flowers was enclosed in a polyacetate bag (19 x 19 x 24 cm) soon after dusk (18.00-19.00 h), after which the air was pumped out from the bag for 60 min at 200 mL/min through a quartz tube (15 mm long; 2 mm diameter) containing a 1:1 mixture of 3 mg Tenax-TA (mesh 60-80, Supelco) and Carbotrap (mesh 20-40, Supelco) using a portable membrane pump (Spectrex PAS-500). A negative control was obtained repeating the same procedure with a stem bearing no flower. Scent samples were subsequently analysed by direct mass spectrometry (MS) coupled to gas

chromatography (GC) analyses as described in Johnson *et al.* (2011). The GC-MS data were processed using MS Workstation 7 Software. Compounds were identified thanks to the library NIST 02 mass spectral through a comparison of the retention times with published data (Adams 2001). Differences in relative emission rate of the 10 major compounds among habitat types (with population as a nested factor) were investigated using a permutational MANOVA (based on non-normal distributions).

5.3.8. Geographical and environmental distances between populations

Geographical distances between populations were calculated from their GPS coordinates. For environmental distances between populations, seven variables that characterize each population were used (altitude, monthly mean minimum temperature, monthly mean maximum temperature, annual rainfall, annual number of rainy days, maximum daily rainfall and Emberger's pluviothermic quotient, Emberger 1930). Climatic variables were provided by Météo-France and were collected by the nearest weather stations from populations. Nine stations were available, one for each population and the same for Bébou and Bébou-Takamaka. These data correspond to climate means over several years, from six to twenty-nine according stations. A principal components analysis was performed on these seven variables and brings together populations according to their respective habitats (Figure 5.2). This result indicates that the principal components can be used as a proxy to quantify habitat heterogeneity. Principally temperatures and altitude separated populations from submountain and mountain forests while rainfalls separated populations from windward and leeward forests (Figure 5.2). Then, Mahalanobis distances between populations were calculated on the first two principal components.

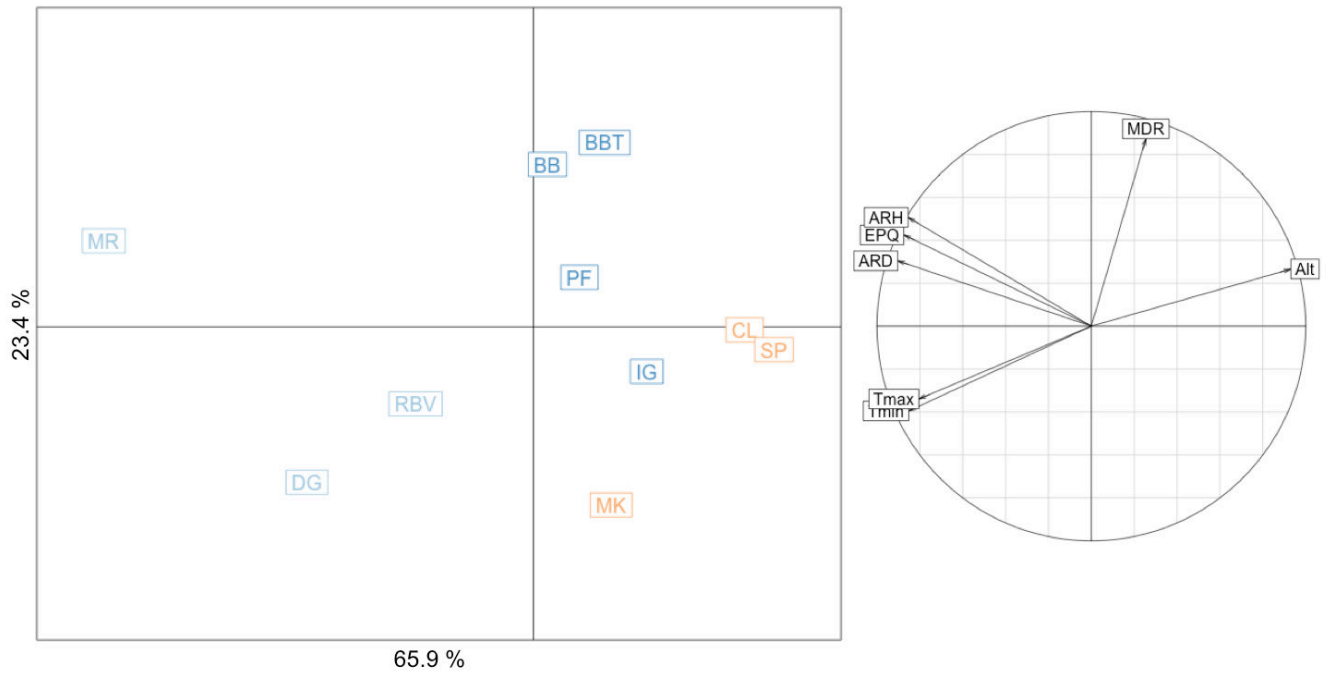


Figure 5.2. Principal components analysis of environmental variation between populations of *Jumellea rossii* based on altitude (Alt), monthly mean minimum (Tmin) and maximum (Tmax) temperatures, annual rainfall height (ARH), annual number of rainy days (ARD), maximum daily rainfall (MDR) and Emberger's pluviothermic quotient (EPQ). The colours correspond to the type of habitat, dark blue for the mountain windward rainforest, light blue for the submountain windward rainforest and orange for the leeward rainforest.

5.3.9. Effect of environmental and geographical factors on genetic and phenotypic divergence among populations

Differentiation in floral morphology and scent between populations was estimated using pairwise Mahalanobis D^2 , calculated in the principal component space. Genetic differentiation between populations was estimated using pairwise F_{ST} values. We first examined independently the role of geographic (IBD) and environmental distances (IBE) in genetic differentiation using Mantel tests. Significance of coefficients and R^2 were estimated after 9999 random permutations completed in GenAlEx 6.5 (Peakall & Smouse 2006, 2012). To analyse the relative role of environment (IBE) and geography (IBD) in phenotypic and genetic differentiation, we then used a new method introduced by Wang (2013) using multiple regression analysis on matrices of genetic, morphological, chemical, geographic, and environmental distances. This

approach allows quantifying how a dependent variable (genetic, morphology, chemistry) responds to changes in several explanatory variables (geography and environment). We applied the R function “MMRR” (Multiple Matrix Regression with Randomization, Wang 2013) independently on genetic, morphological and chemical distance to obtain the regression coefficients and significance values for all parameters after 9999 random permutations. To exactly calculate the relative importance of the two explanatory distance matrices on the dependent matrix, these should not be related (Wang 2013). This is verified using a Mantel test after 9999 permutations.

5.4. Results

5.4.1. Genetic diversity

The analysis of 13 microsatellite loci in 10 populations and 410 individuals of *J. rossii* revealed high levels of genetic variability within populations, with mean numbers of alleles per locus (A_R) ranging from 5.57 to 9.27 and expected heterozygosities (H_E) from 0.680 to 0.793 (Table 5.2). Level of genetic diversity in terms of A_R and H_E was higher in MLR than in SWR (Table 5.2; $P = 0.002$ and $P = 0.0005$ respectively) but not significantly different for the other pairs of habitats. All populations showed private alleles (A_P), from 1 to 8 according to the population (Table 5.2). However, only 17 out of 46 private alleles had a frequency >0.02 , whereas only 4 had a frequency >0.05 . F_{IS} estimates range from 0.164 to 0.523, and exact tests showed a significant deviation from HWE due to a heterozygote deficiency in all populations (Table 5.2). No pair of loci in disequilibrium was observed, suggesting that all loci are independent. The average frequency of null alleles resulted 0.08 ± 0.10 .

Table 5.2. Estimates of genetic diversity at 13 microsatellite loci in 12 populations of *Jumellea rossii* and means per habitat type.

Population	<i>N</i>	<i>A_L</i>	<i>A_R</i>	<i>A_P</i>	<i>H_E</i>	<i>H_O</i>	HWE	<i>F_{IS}</i>
<i>/Habitat</i>								
PF	23	8.46 ± 3.55	8.34 ± 3.48	5	0.758 ± 0.241	0.405 ± 0.159	***	0.469
BB	50	9.38 ± 3.10	8.02 ± 2.57	4	0.748 ± 0.148	0.394 ± 0.148	***	0.477
BBT	48	9.08 ± 3.45	7.80 ± 2.75	1	0.759 ± 0.195	0.636 ± 0.195	***	0.164
IG	52	9.23 ± 3.11	7.89 ± 2.29	4	0.756 ± 0.151	0.469 ± 0.151	***	0.383
CL	40	10.38 ± 3.55	8.83 ± 2.96	3	0.791 ± 0.173	0.476 ± 0.136	***	0.400
SP	50	9.23 ± 3.17	8.35 ± 2.76	3	0.772 ± 0.136	0.397 ± 0.184	***	0.490
MK	34	11.00 ± 3.76	9.27 ± 3.05	8	0.793 ± 0.184	0.596 ± 0.173	***	0.250
MR	21	5.62 ± 1.71	5.57 ± 1.70	1	0.680 ± 0.156	0.328 ± 0.156	***	0.523
DG	52	9.62 ± 3.66	7.88 ± 2.93	5	0.724 ± 0.149	0.490 ± 0.149	***	0.325
RBV	40	9.15 ± 3.16	7.85 ± 2.57	6	0.715 ± 0.152	0.443 ± 0.152	***	0.382
<i>MWR</i>	<i>173</i>	<i>9.04 ± 0.40</i>	<i>8.01 ± 0.24</i>	<i>3.5</i>	<i>0.755 ± 0.005</i>	<i>0.476 ± 0.112</i>	***	<i>0.373</i>
<i>MLR</i>	<i>124</i>	<i>10.20 ± 0.90</i>	<i>8.82 ± 0.46</i>	<i>4.7</i>	<i>0.785 ± 0.012</i>	<i>0.490 ± 0.100</i>	***	<i>0.380</i>
<i>SWR</i>	<i>113</i>	<i>8.13 ± 2.19</i>	<i>7.10 ± 1.33</i>	<i>4.0</i>	<i>0.706 ± 0.023</i>	<i>0.420 ± 0.083</i>	***	<i>0.410</i>
Total/mean	410	9.12 ± 1.42	7.98 ± 0.97	4.1	0.750 ± 0.035	0.463 ± 0.094	***	0.386

A_L, mean number of alleles per locus ± s.d.; *A_R*, mean allelic richness per locus ± s.d.; *A_P*, private allelic richness; *H_E*, expected heterozygosity over all loci ± s.d.; *H_O*, observed heterozygosity over all loci ± s.d.; HWE, result of test for departures from Hardy–Weinberg Equilibrium, ****P*<0.001; *F_{IS}*, fixation index of Weir and Cockerham; MWR, mean per population of mountain windward rainforest; MLR, mean per population of mountain leeward rainforest; SWR, mean per population of submountain windward rainforest.

5.4.2. Genetic differentiation

According to the AMOVA, 93.5% of the total genetic variation was found within populations, only 4.4% among populations of a same habitat type, and 2.1% among habitat types. The average pairwise *F_{ST}* across population was 0.040 ± 0.011 ranging from 0.023 to 0.063. All values were highly significant and indicated a low genetic differentiation among populations. When allele sizes were taken into account, the

global genetic differentiation $R_{ST} = 0.073$ was not significantly different than that based on allele identities, global $F_{ST} = 0.056$ ($P > 0.05$). The global Hedrick's standardized G'_{ST} was 0.231 among all populations. Genetic differentiation was slightly but significantly higher (Wilcoxon rank test, $W = 342.5$, $P = 0.0002$) among populations of different habitat types ($G'_{ST} = 0.233 \pm 0.048$ ranging between 0.154 and 0.315) than among populations of a same habitat ($G'_{ST} = 0.150 \pm 0.029$ ranging between 0.112 and 0.201).

The mean effective population size (N_e) across populations was 32 individuals with a minimum of 6 in Mourouvain (95% CI: 3-8) and a maximum of 91 in Basse-Vallée (95% CI: 57-199). In addition to Basse-Vallée, only Cilaos had a N_e of more than 40 individuals ($N_e = 75$; 95% CI: 55-112). The results from five different runs with the software BIMr were concordant and estimated that the mean immigration rate between each pair of subpopulations was 3.91×10^{-3} with a minimum of 9.88×10^{-11} and a maximum of 1.05×10^{-1} . The numbers of recent migrants per generation (N_m) between each pair of subpopulations were obtained by multiplying the effective size of the population of origin by migration rates (Table 5.3). All N_m values were less than one with two exceptions: 8.06 migrants per generation from Basse-Vallée to Dugain and 1.81 from Saint-Paul to Cilaos. Moreover, the best model explaining the migration rates among populations was the one including only environmental distances as an explanatory variable (Table 5.4). The regression coefficient for the effect of environment was negative; migration rates are thus reduced among populations from different environments (Table 5.4).

Table 5.3. Estimated number of recent migrants (N_m) per generation between populations of *Jumellea rossii*. N_m were obtained by multiplying the effective size of the population of origin by recent migration rates per generation. The direction of migration is given from populations in columns (origin) to those in lines (destination).

Into	PF	BB	BBT	IG	SP	MK	CL	MR	DG	RBV
From										
PF	36.90	1.0x10 ⁻⁸	1.5x10 ⁻⁸	1.0x10 ⁻⁸	7.5x10 ⁻⁹	3.8x10 ⁻⁹	3.9x10 ⁻⁸	1.6x10 ⁻⁹	5.7x10 ⁻⁹	3.5x10 ⁻⁸
BB	1.3x10 ⁻⁸	16.20	2.6x10 ⁻⁸	4.4x10 ⁻⁹	3.6x10 ⁻⁹	2.4x10 ⁻⁹	2.0x10 ⁻⁸	1.0x10 ⁻⁹	3.1x10 ⁻⁹	2.4x10 ⁻⁸
BBT	7.6x10 ⁻⁹	6.4x10 ⁻⁹	30.40	2.6x10 ⁻⁹	1.9x10 ⁻⁹	1.1x10 ⁻⁹	1.1x10 ⁻⁸	5.6x10 ⁻¹⁰	1.6x10 ⁻⁹	1.1x10 ⁻⁸
IG	1.3x10 ⁻⁸	3.4x10 ⁻⁹	6.3x10 ⁻⁹	17.00	6.2x10 ⁻⁹	3.2x10 ⁻⁹	3.9x10 ⁻⁸	8.0x10 ⁻¹⁰	2.5x10 ⁻⁹	1.7x10 ⁻⁸
SP	1.2x10 ⁻⁸	4.1x10 ⁻⁹	9.5x10 ⁻⁹	8.4x10 ⁻⁹	17.10	3.5x10 ⁻⁹	4.1x10 ⁻⁸	1.8x10 ⁻⁹	3.5x10 ⁻⁹	2.1x10 ⁻⁸
MK	9.9x10 ⁻⁹	2.8x10 ⁻⁹	5.5x10 ⁻⁹	7.9x10 ⁻⁹	5.5x10 ⁻⁹	11.30	2.7x10 ⁻⁸	6.3x10 ⁻¹⁰	3.2x10 ⁻⁹	2.2x10 ⁻⁸
CL	0.67	0.19	0.59	0.21	1.81	0.44	59.12	0.02	0.04	0.30
MR	7.9x10 ⁻⁹	4.7x10 ⁻⁹	6.7x10 ⁻⁹	3.0x10 ⁻⁹	2.2x10 ⁻⁹	1.4x10 ⁻⁸	1.2x10 ⁻⁸	5.60	6.4x10 ⁻⁹	3.3x10 ⁻⁸
DG	0.16	0.39	0.04	0.04	0.02	0.03	0.09	0.07	13.03	8.06
RBV	2.1x10 ⁻⁸	6.6x10 ⁻⁹	1.7x10 ⁻⁸	6.8x10 ⁻⁹	5.3x10 ⁻⁹	4.7x10 ⁻⁹	2.9x10 ⁻⁸	2.3x10 ⁻⁹	9.5x10 ⁻⁹	91.30

Table 5.4. Posterior model probabilities for models explaining migration rates among populations of *Jumellea rossii*.

Factors included	Model probability	Regression coefficients estimated [95% HPDI]		
		$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\alpha 3$
None	0.201			
Geography	0.112	-0.30 [-2.32; 2.29]		
Environment	0.465		-0.77 [-2.96; 2.90]	
Geography and environment	0.162	-0.26 [-2.54; 2.14]	-0.82 [-2.84; 2.95]	
With interaction	0.060	-0.32 [-2.38; 1.97]	-0.54 [-2.56; 2.76]	0.23 [-2.05; 1.71]

Values represent means of the 10 runs.

5.4.3. Genetic structure

Clustering of microsatellite genotypes using InStruct algorithm showed that the distribution of ΔK with increasing K presented two modal values; the higher is

located at $K = 2$ and the second, much lower, at $K = 3$ (Figure 5.3B). K determination using K-means clustering of principal components and the Bayesian Information Criterion revealed $K = 3$ as the best number of cluster to use (Figure 5.3A). Moreover, $K = 3$ seemed to be the best model to describe our data and appeared to be better than $K = 2$ to reflect biological processes because it also corresponded to the number of different habitats.

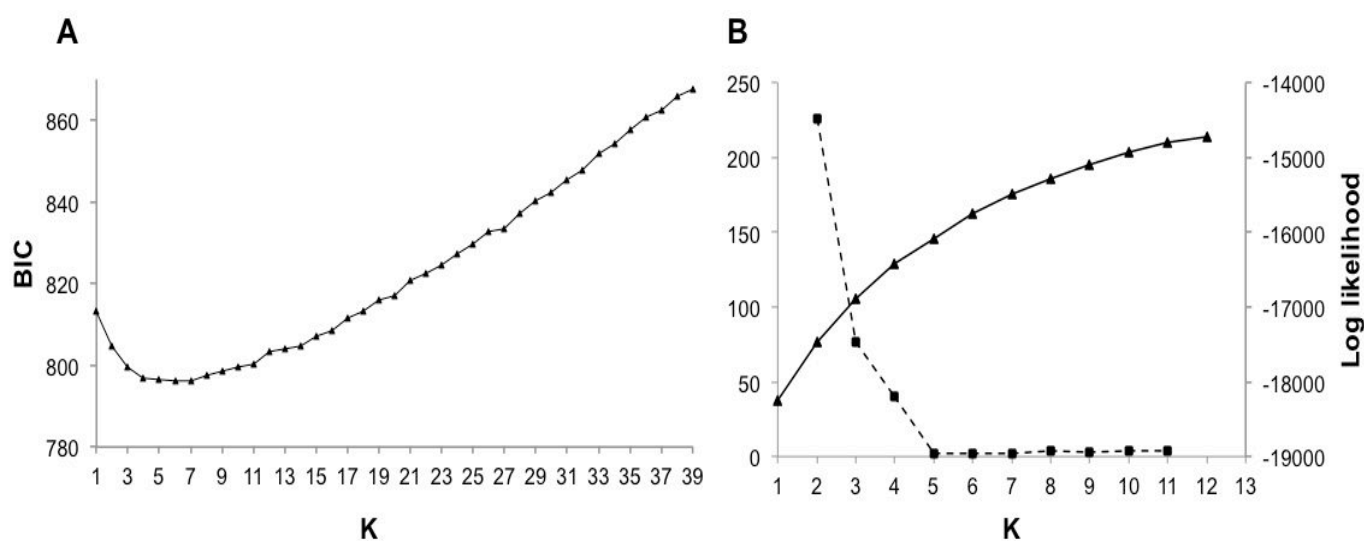


Figure 5.3. Detection of the number of genetic clusters K . (A) Using K-means algorithm and the Bayesian Information Criterion (BIC) for each K with adegenet (Jombart *et al.* 2010). (B) Using the log-likelihood (triangles) and ΔK statistic (squares) according to Evanno *et al.* (2005) averaged over ten runs for each K with InStruct (Gao *et al.* 2007).

The population genetic structures at $K = 3$ using Bayesian clustering (InStruct) and the results of DAPC (adegenet) are shown in Figure 5.4. InStruct clearly distinguished three clusters according to habitat types (Figure 5.4A), all populations in SWR forming the first, all populations in MLR the second, and all populations in MWR the third. Despite an apparent genetic structure, there was admixture between all clusters. When the three genetics clusters are defined a priori by habitat type (DAPC, Figure 5.4B), assignment analyses reveal the same pattern as described above.

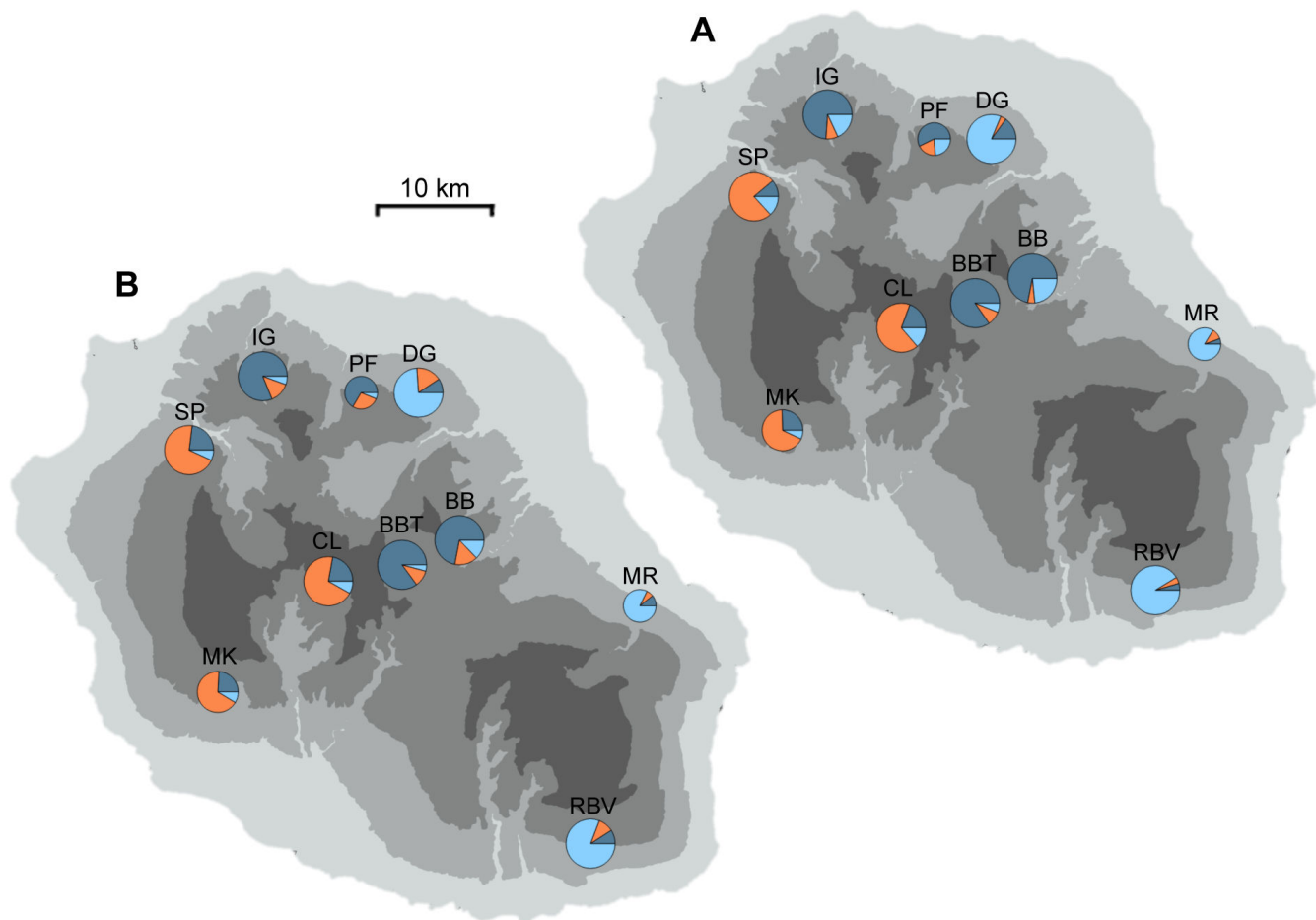


Figure 5.4. Spatial genetic structure of *Jumellea rossii* populations obtained by two different methods. Genetic structure is inferred (A) by a model-based clustering method implemented in InStruct and (B) by discriminant analysis of principal components with habitat type as grouping factor. At each location, pie charts indicate the mean proportion of individual memberships in each cluster for $K = 3$ (A) or each habitat type (B) and their size is proportional to the number of individuals sampled.

5.4.4. Differentiation in phenotypic traits

The MANOVA was highly significant for habitats and populations within habitats ($P < 0.0001$ in both cases), indicating that significant morphological differences exist among habitats and among populations within habitat. This variation could be effectively visualized using the two first canonical variables of the CDA for habitat comparisons (Figure 5.5). At the habitat level, CV1 and CV2 accounted all of the variation, describing 69.6% and 30.4% of the variation, respectively. CV1 separated SWR from the two other habitats principally based on lip width and lateral petal

width with respectively positive and negative coefficients. CV2 primarily described adaxial sepal width differences with a negative coefficient, distinguishing MWR and MLR.

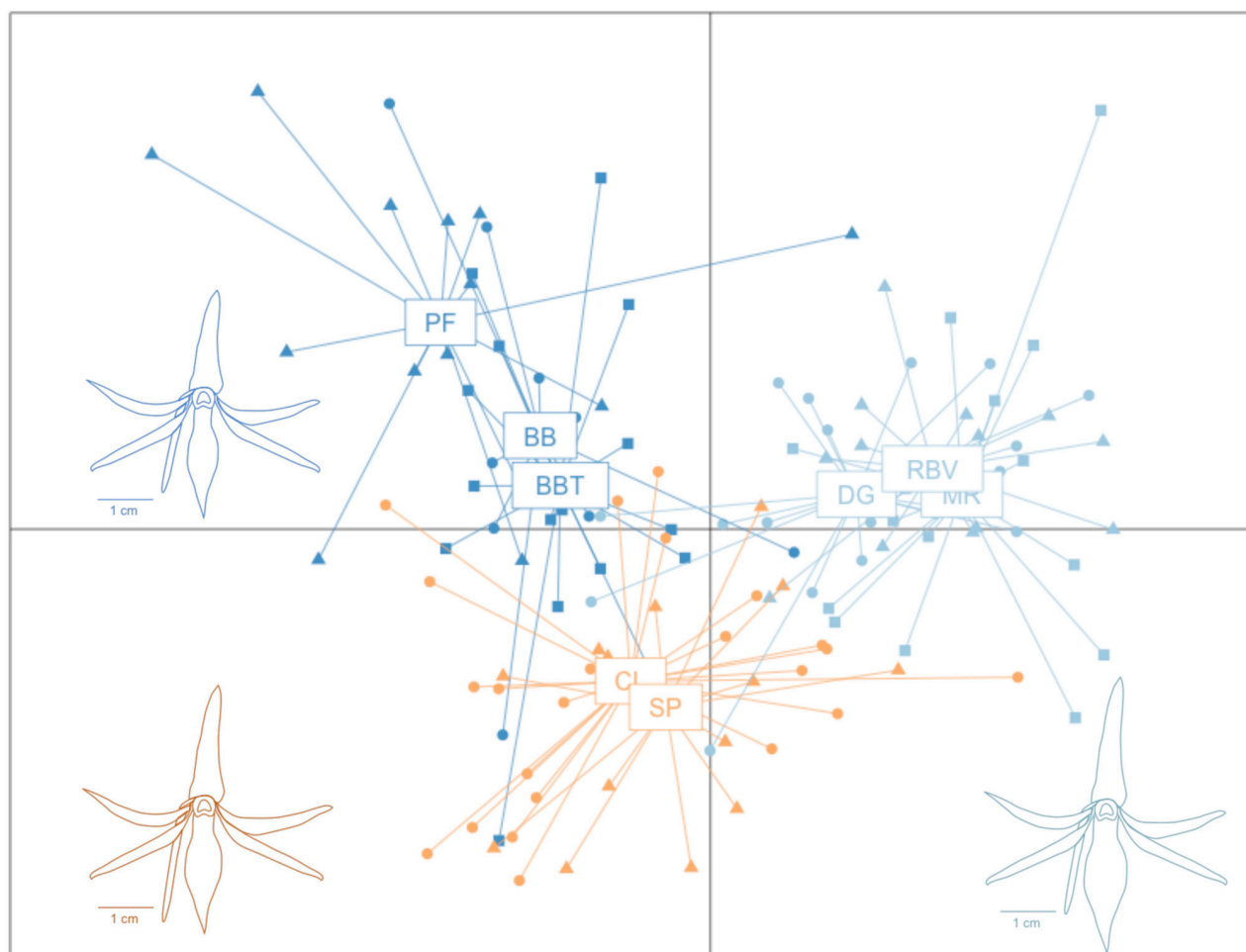


Figure 5.5. Canonical discriminant analysis of 10 morphological floral traits with habitat type as grouping factor. Flowers of one population of each habitat (PF, CL and RBV) are drawn. The colours correspond to the type of habitat, dark blue for the mountain windward rainforest, light blue for the submountain windward rainforest and orange for the mountain leeward rainforest.

Means and standard deviations from measurements of ten floral characters in *J. rossii* are shown in Table 5.5. All traits varied significantly among habitat types and all except adaxial sepal width varied significantly among populations of a same habitat type. However, only spur length, lip width and adaxial sepal width were more

variable between habitats than between populations in the same habitat. Spur length and lip width were the most variable traits between habitat types: they were significantly smaller in SWR than in MWR or MLR but no significant difference was observed between MWR and MLR.

Table 5.5. Comparison of the ten measured floral traits of *Jumellea rossii* among habitats [mean \pm s.d.].

Floral trait	Habitat			Nested ANOVA	
	MWR	MLR	SWR	Habitat	Population within habitat
	(<i>N</i> = 40)	(<i>N</i> = 42)	(<i>N</i> = 51)		
Spur Length	20.49 \pm 1.79 ^a	20.64 \pm 2.31 ^a	18.28 \pm 1.97 ^b	*** 23.5%	* 6.8%
Column Height	2.26 \pm 0.71 ^a	2.01 \pm 0.28 ^b	2.03 \pm 0.18 ^b	** 6.9%	*** 15.3%
Lip Width	6.62 \pm 0.57 ^a	6.59 \pm 0.57 ^a	7.26 \pm 0.61 ^b	*** 23.2%	** 9.8%
Lip Length	21.40 \pm 1.62 ^a	22.29 \pm 2.17 ^{ab}	23.00 \pm 2.09 ^b	*** 10.3%	*** 15.7%
Lateral Petal Width	3.39 \pm 0.44 ^a	3.13 \pm 0.28 ^b	3.22 \pm 0.29 ^b	*** 10.2%	*** 42.3%
Lateral Petal Length	20.63 \pm 1.67 ^a	21.77 \pm 2.52 ^b	21.66 \pm 2.00 ^{ab}	*** 13.1%	*** 18.2%
Adaxial Sepal Width	4.42 \pm 0.39 ^a	4.78 \pm 0.40 ^b	4.60 \pm 0.33 ^c	*** 14.2%	NS 6.5%
Adaxial Sepal Length	19.87 \pm 1.70 ^a	21.57 \pm 2.37 ^b	21.80 \pm 2.16 ^b	*** 14.6%	*** 16.4%
Lateral Sepal Width	3.55 \pm 0.42 ^a	3.70 \pm 0.24 ^b	3.76 \pm 0.28 ^b	*** 8.2%	*** 36.7%
Lateral Sepal Length	21.01 \pm 1.77 ^a	22.80 \pm 2.41 ^b	22.69 \pm 2.17 ^b	*** 5.4%	*** 16.3%

MWR, Mountain windward rainforest; MLR, Mountain leeward rainforest; SWR, Submountain windward rainforest. Means followed by the same letter at the same row are not significantly different ($P < 0.05$) according to the pairwise t-test with Bonferroni correction, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

In the analysis of floral volatiles, we identified ten major compounds across all 16 individuals examined (Table 5.6): that is, nine aromatic compounds and one monoterpene. The most common compounds were (in decreasing order) benzaldehyde, benzyl acetate, benzyl alcohol and eugenol, all found in any individuals. Other trace compounds were found in some individuals (Table 5.6). The permutational MANOVA was not significant for habitats and populations within

habitats ($P = 0.91$ and $P = 0.70$ respectively), indicating that there was no significant difference in the floral volatiles among habitats and among populations within habitat.

Table 5.6. Mean relative amounts of the volatile compounds identified in the floral scent of different population of *Jumellea rossii* emitted at dusk.

Compounds	T _R [*]	BBT	CL	SP	DG	MR	RBV
Monoterpenes							
Limonene	8.621	2.18	0.00	0.00	1.46	0.00	0.02
Aromatics							
Anisole	10.381	5.48	0.00	0.12	0.58	0.00	0.00
Benzaldehyde	12.684	47.42	60.62	42.57	44.71	53.36	61.46
Benzyl alcohol	16.713	15.83	16.31	25.04	20.10	15.26	10.30
Benzyl acetate	15.058	21.97	12.83	25.01	15.36	16.31	16.42
Benzyl benzoate	23.608	0.00	0.00	0.00	0.36	0.03	0.28
Chavicol	21.059	0.22	0.15	0.15	0.59	1.02	0.38
Dichlorobenzene	11.633	0.25	0.00	0.00	3.01	0.09	0.00
Eugenol	19.579	6.65	10.08	7.10	13.41	13.66	11.42
Vanillin	23.885	0.00	0.02	0.00	0.43	0.28	0.00

*T_R : Retention times on apolar column SPB-5.

5.4.5. Effect of environmental and geographical factors on genetic and phenotypic divergence among populations

Mantel tests between geographic distances and genetic distances and between environmental distances and genetic distances revealed that both IBD and IBE played a significant and independent role in genetic differentiation of populations. Indeed, environmental and geographic distances were both strongly associated with genetic distances but not significantly correlated with each other (Figures 5.6A-C). However, the multiple matrix regression analysis, used to explore the relative role of environment (IBE) and geography (IBD) in genetic differentiation, pointed out that

the regression coefficient for environmental distances ($\beta_E = 0.476$, $P = 0.004$) was about two times greater than the regression coefficient for geographic distances ($\beta_G = 0.284$, $P = 0.043$) suggesting that IBE explained the majority of genetic distance (Figure 5.6D). Concerning the phenotypic differentiation, only the geographic distances contributed to the morphological differentiation ($\beta_G = 0.385$, $P = 0.038$) compared to environmental distances, which did not have a significant role ($\beta_E = 0.357$, $P = 0.076$). Neither geographical distances nor environmental distances significantly explained the chemical distances between populations.

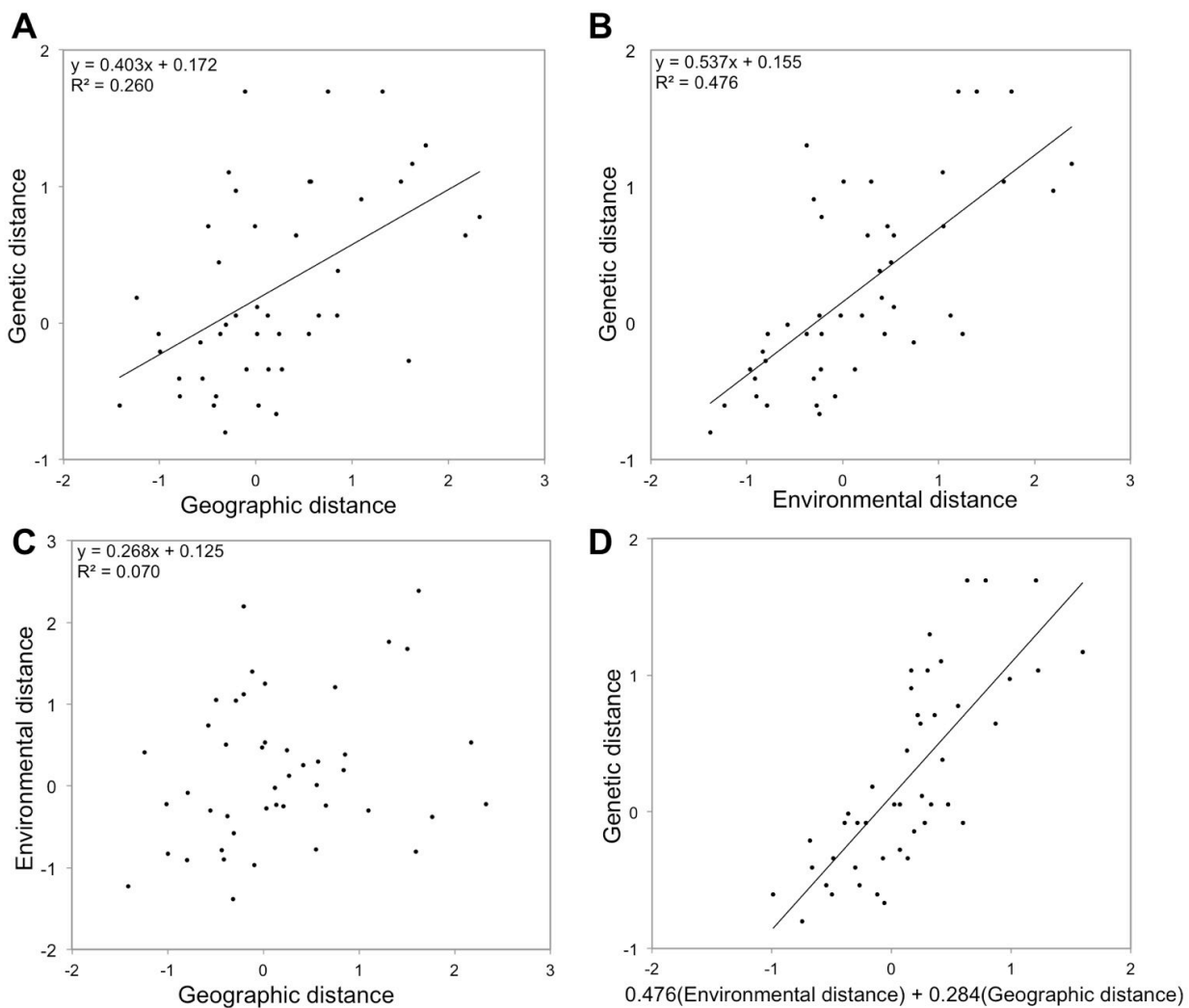


Figure 5.6. Multiple matrix regression with randomization (MMRR) analysis performed on genetic distances. Scatterplots show patterns of isolation-by-distance (A), isolation-by-ecology (B) and the absence of eco-spatial autocorrelation (C) according to (Shafer & Wolf 2013). When correlations are significant (Mantel test, $P < 0.05$), regression lines are drawn. Plot (D) is based on the results of the multiple matrix regression analysis for the effects of both geographical and environmental distances on genetic distances.

5.5. Discussion

5.5.1. Isolation-by-habitat as a primary factor causing population differentiation in *J. rossii*

We found a significant genetic differentiation between populations of the epiphytic orchid species *Jumellea rossii* at relatively small geographic scale i.e. less than the total surface area of Réunion (2,500 km²). Genetic clustering analyses showed that the general pattern of population differentiation in *J. rossii* was structured geographically in relation with the variation in forest type. Moreover, multiple matrix regression analyses also indicated that the three main forest types where *J. rossii* was found, and which were characterized by seven environmental variables in the analyses, primarily caused population differentiation in this orchid species compared to geography. In other words, gene flow seems to occur preferentially among populations of a similar habitat type. Conversely, gene flow seems to occur less frequently between populations of different habitat types, even if these are geographically close. This was well illustrated by the two populations growing on eastern slopes of the island at Plaine des Fougères (1220 m) and Dugain (770 m): although only 5 km separate them, we observed a significant genetic differentiation between these two populations ($G_{ST}^* = 0.186$) that mainly differed in respect to the forest type. The general pattern of isolation-by-habitat was also supported by a Bayesian analysis revealing that the best model explaining the migration rates among populations was the one based on the environmental variables only. Thus, migrations among populations whose environmental characteristics are dissimilar appear to be less frequent.

Pattern of genetic differentiation obtained with microsatellites markers can be viewed as the result of stochastic evolutionary processes (Schlötterer 2000), and neutral genetic differentiation can thus suggest that random mechanisms (i.e. drift in combination with spatially restricted gene flow) underlie divergence between

populations. Moreover, small effective populations sizes, less than one migrant per generation between populations and high inbreeding coefficients in *J. rossii* are the conditions under which genetic drift can occur (Wright 1931; Frankham *et al.* 2004). In flowering plants, gene flow and migration between populations are caused by pollen and/or seed dispersal. Orchids have dust-like seeds that are wind-borne and, therefore, would have the potential for long-distance dispersal. Nevertheless, recent studies demonstrated that orchid seeds establish better close to their mother plant (Machon *et al.* 2003; Jacquemyn *et al.* 2007a; Jersáková & Malinová 2007), even for some epiphytic taxa (Ackerman *et al.* 1996). Concerning pollen dispersal in *J. rossii*, one likely explanation for the observed pattern of isolation-by-habitat would be variation in the flowering phenology. Differences in flowering phenology between populations growing under different climatic conditions, e.g. in more or less elevated rainforests, should restrict gene flow through asynchronous pollination and ultimately cause genetic isolation. For instance, the two geographically close and genetically differentiated populations growing at Plaine des Fougères and Dugain blossomed in late December-early January and late February-early March respectively. Nevertheless, variation in flowering phenology alone cannot explain the overall pattern of genetic differentiation. Indeed, populations growing at the same altitude along the environmental gradient from east to west, i.e. in mountain windward rainforests or in mountain leeward rainforest respectively, flower synchronously. For example, the populations growing at Cilaos (1400 m) and at Bébou-Takamaka (1370 m) both blossomed in late December-early January. Moreover, as they are 8 km away from one another, they could have potentially exchanged genes through pollen flow. Despite the fact that these flowering populations coexist spatially and temporally, we observed a significant genetic differentiation ($G'_{ST} = 0.219$) between them. In this particular case, as in several other cases, we believe that gene flow may be limited by IBE. Under IBE, local adaptation of populations to their habitat drives their ecological niche differentiation and thus limits the likelihood of gene flow between

them (Shafer & Wolf 2013). In plants, ecological isolation is mainly based on the selection against migrants (Nosil *et al.* 2005; Lowry *et al.* 2008b) i.e. pollinating insects and/or seed dispersal. Divergent selection between distinct environments is probably the best understood driver for population differentiation and speciation (Rundle & Nosil 2005) and has been proposed as a major contributing factor to explain the diversification of species in environmentally heterogeneous ecosystems such as rainforests (Ogden & Thorpe 2002). In the study area i.e. Réunion, IBE was also suggested as the main factor causing local population differentiation in a passerine bird (Milá *et al.* 2010).

5.5.2. Is phenotypic differentiation consistent with genetic differentiation?

We previously showed that both IBD and IBE contributed to the pattern of genetic differentiation among populations of *J. rossii* but that the latter factor was more likely to explain it. Under IBE, the proximal cause of population differentiation is ecologically-based divergent selection (Rundle & Nosil 2005; Shafer & Wolf 2013) which can arise, in flowering plants, from pollinator preferences for specific phenotypic floral traits (Rundle & Nosil 2005; Schluter 2009). Differentiation of floral morphology among populations of *J. rossii* was concordant with genetic differentiation and was also structured by habitat. For example, lip width tends to decrease along the gradient from east to west, and spur length tends to increase with altitude. Even if such consistent patterns of morphological variation can theoretically arise through random processes (Wright 1931), this scenario becomes unlikely when many populations are considered and natural selection or phenotypic plasticity are more realistic explanations. Studies that have addressed phenotypic selection in natural orchid populations have shown that interactions with pollinators can lead to selection on floral traits that influence pollination efficiency, notably the spur length (Nilsson 1988; Johnson & Steiner 1997; Sletvold & Ågren 2010). However, knowledge

on the distribution, relative abundance and behaviour of pollinators of *J. rossii* in each habitat type is too scarce to support the hypothesis of pollinator-mediated divergence. Moreover, in this species, floral volatiles did not differ significantly between populations or between habitats. Floral odour is highly relevant for pollinator attraction and is consequently expected to be under strong selection, especially in night pollinated flowers (Raguso *et al.* 2003). A comparative study of the variation in floral scent between two closely related orchids demonstrated that the overall variation was significantly lower in the rewarding species than in the deceptive one, suggesting a stabilizing selection imposed by floral constancy of the pollinators in the rewarding species (Salzmann *et al.* 2007); this might also be the case in *J. rossii*. Moreover, spatio-temporal variation in pollinators of a generalist plant might likely result in inconsistent selective regimes that will greatly reduce the possibilities of local adaptation to particular pollinators (Herrera 1988). *Jumellea rossii* has a generalist pollination system because three species of effective pollinators have been identified so far but their relative abundance in each habitat type, their influence on the orchid reproductive success and the dispersal distance of pollen remains to be investigated. Our results suggest that specific plant-pollinator mutualism does not play a major role in the population differentiation of *J. rossii* but that other factors are involved. In this case, phenotypic plasticity could be a likely explanation for the morphological differentiation of populations. Plasticity of floral traits has indeed been documented in response to variation in environmental factors such as water, light, temperature and nutrient availability (Weinig 2002; Dorken & Barrett 2004; Caruso 2006). Furthermore, phenotypic plasticity in floral morphology can influence the strength and direction of pollinator-mediated natural selection. For example, if floral traits respond plastically to abiotic environment, pollinator-mediated selection on these traits may differ between different habitats (Carroll *et al.* 2001).

5.5.3. Are populations of *J. rossii* undergoing speciation?

We found that populations of *J. rossii* were genetically structured according to the forest types and interpreted it as the result of habitat filtering in combination with variation in flowering phenology. One question here remains: are populations of *J. rossii* undergoing speciation on Réunion? From a broader perspective, the relationship between population divergence and speciation is not always obvious. Indeed, some species can maintain high population differentiation without necessarily splitting into several lineages (Magurran 1998). Conversely, speciation can sometimes emerge in the presence of gene flow (Nosil 2008; Pinho & Hey 2010), in particular when the diverging populations become highly adapted to their respective habitats (Papadopoulos *et al.* 2011; Osborne *et al.* 2013).

Although populations of *J. rossii* are genetically differentiated, there is no clear evidence that this orchid species is undergoing speciation. However, genetic differentiation between populations has long been perceived as an early step during the speciation process (Stebbins 1950; Grant 1981; Levin 2000; Coyne & Orr 2004) and reduction in gene flow i.e. reproductive isolation is critical prior to speciation (Givnish 2010). Moreover, intra-island cladogenesis appears to be recurrent on elevated remote oceanic islands, possibly because colonization rate is low, ecological space is initially unsaturated and ecological heterogeneity is high (Whittaker *et al.* 2008; Losos 2010) particularly when the maximum topographic complexity is reached (Whittaker *et al.* 2008). In Réunion, there are strong evidences that altitudinal gradient and habitats diversity promote partition among species. First, habitat type coupled with altitude influence orchid species composition and the distribution of orchid breeding systems (Jacquemyn *et al.* 2005). Second, ecological speciation along altitudinal and environmental gradients is strongly suggested by phylogenetic studies that have identified intra-island radiations in various plant taxa, such as for instance the genera *Psiadia* (Strijk *et al.* 2012) and *Dombeya* (Le Péchon *et al.* 2010). From a single event of colonization from Madagascar to Réunion, possibly through some

Mauritian members that went extinct, these genera have repeatedly undergone speciation along the turnover of forest types found on Réunion (Le Péchon *et al.* 2010; Strijk *et al.* 2012). In the orchid genus under study i.e. *Jumellea*, we observe the same tendency in the phylogeny (Micheneau *et al.* 2008a; Rakotoarivelo *et al.* 2012) notably in the clade of *J. rossii* that diverged from the lowland forest species *J. fragrans* through adapting to the cloudy mountain and submountain rainforests. Further research on the genetic differentiation among populations of *J. fragrans* and *J. rossii* will help understanding the mechanisms driving speciation in this orchid clade and perhaps answering the question on whether populations of *J. rossii* are undergoing speciation.

5.6. Acknowledgements

We would like to thank: Ali M'Dere and Sylvain Guichard for field assistance; the Parc National de la Réunion for authorizing this research inside the National Park (sampling permit code: DIR/I/2012/002); the Office National des Forêts de la Réunion for material support; Météo-France Réunion for providing climatic data; Prof S.D. Johnson for having free of charge lent all the equipment during the chemical investigations; University of Réunion for providing supercomputer facilities; two anonymous reviewers and R.L. Tremblay for their valuable comments on this manuscript. This work was supported by the Conseil Général de la Réunion, University of Réunion and by the Ministère français des Outre-mer through the ORCHIFAH project.

6 Synthèse et discussion générale



La problématique générale dans laquelle s'est inscrite cette thèse est l'étude de la diversification biologique en milieu insulaire. Elle a été abordée en considérant la classification moderne des modes de spéciation, basée sur les mécanismes à l'origine de l'isolement reproducteur (voir chapitre 1.1.7). Dans ce cadre, l'hypothèse nulle était l'absence de rôle des interactions écologiques et de la sélection divergente dans la spéciation. L'hypothèse de recherche a donc été la spéciation écologique comme mode de diversification. Afin de tester cette hypothèse, les rôles respectifs des pollinisateurs et de l'habitat dans l'évolution de l'isolement reproducteur ont été étudiés chez le faham, un clade d'orchidées en cours de diversification.

Après une synthèse des principaux résultats, cette discussion évalue dans un premier temps dans quelles mesures l'hypothèse de recherche peut être acceptée, puis dans un deuxième temps, estime le rôle des facteurs étudiés (pollinisateur et habitat) dans la progression de la spéciation. Enfin, les applications des résultats obtenus en termes de taxinomie et de conservation sont abordées.

6.1. Synthèse des principaux résultats

Dans le chapitre 2, l'objectif était de clarifier le statut taxinomique du faham, une orchidée bien connue des réunionnais pour son utilisation traditionnelle et jusqu'alors nommée *Jumellea fragrans* (Thouars) Schltr (1915) par les botanistes. Cette orchidée présente en effet d'importantes variations morphologiques liées à l'altitude et les études phylogénétiques semblent indiquer qu'elle est en cours de diversification. Des mesures morphologiques végétatives et florales effectuées dans trois populations représentatives de l'amplitude altitudinale du faham indiquent que la population de basse altitude se distingue significativement des deux autres par sa morphologie et correspond à la description de *J. fragrans*. Les deux autres populations correspondent à une espèce décrite beaucoup plus tard sous le nom de *Jumellea rossii* Senghas (1967). Dans le chapitre 3, l'objectif était de déterminer, à partir d'un échantillonnage conséquent (20 populations et utilisation de marqueurs moléculaires),

des Unités Évolutives Significatives (UES) au sein du faham en vue de sa conservation. Les patrons de différenciation génétiques (microsatellites nucléaires) et phénotypiques (morphologie florale) obtenus permettent de distinguer trois UES, une regroupant toutes les populations de *J. rossii*, une regroupant les populations de *J. fragrans* de forêt humide de basse altitude et une regroupant les populations de *J. fragrans* de forêt semi-sèche. Les risques d'extinction ont ensuite été estimés pour chaque UES en utilisant les critères définis par l'UICN et permettent de classer *J. rossii* dans la catégorie 'Préoccupation mineure' (LC), *J. fragrans* de forêt humide dans la catégorie 'Vulnérable' (VU) et *J. fragrans* de forêt semi-sèche dans la catégorie 'En danger' (EN). Les chapitres 4 et 5 se sont davantage intéressés à l'étude des processus évolutifs ayant engendré les patrons de différenciation observés aux échelles inter et intraspécifique respectivement.

6.2. Un cas probable de spéciation écologique

6.2.1. Le rôle des pollinisateurs

Trois conditions sont nécessaires pour que la spéciation par changement de pollinisateur satisfasse les prédictions spécifiques de la spéciation écologique (van der Niet *et al.* 2014). Premièrement, des pollinisateurs différents doivent être les agents de la sélection divergente. Deuxièmement, la variabilité de la distribution géographique des pollinisateurs doit provoquer une mosaïque de sélection divergente et entraîner l'adaptation locale au pollinisateur le plus efficace par divergence des traits floraux. Troisièmement, cette divergence des traits floraux doit réduire l'attraction et/ou l'efficacité du pollinisateur d'origine et donc contribuer à l'isolement reproducteur entre les populations adaptées aux différents pollinisateurs. Même si cette thèse a abordé principalement les deux derniers aspects, deux arguments peuvent être avancés pour soutenir la première condition. Les pollinisateurs influent directement sur la valeur sélective des orchidées car ce sont eux

qui assurent leur reproduction sexuée (Harder & Johnson 2009; Ollerton *et al.* 2011). Ceci est particulièrement vrai chez le faham dont les deux espèces ne sont pas autofertiles (Blambert *et al.*, données non publiées). D'autre part, les espèces de pollinisateurs se distinguent par leur morphologie et leur sensibilité aux traits attractifs des plantes (Fenster *et al.* 2004; Schiestl & Schlüter 2009). Ainsi, lorsqu'une espèce d'orchidée est soumise à différents environnements de pollinisation, la sélection divergente tend à favoriser les traits floraux qui attirent et sont compatibles mécaniquement avec les pollinisateurs de chaque environnement (Kay & Sargent 2009). La deuxième condition a été étudiée indirectement en mesurant la divergence de traits floraux responsables de l'attraction (composition chimique du bouquet floral et morphologie florale) ou de l'adéquation mécanique entre la plante et le pollinisateur (principalement la taille de l'éperon). Enfin, la troisième condition a été étudiée en comparant la divergence des traits floraux à l'isolement reproducteur entre les populations.

Les syndromes de pollinisation ont d'abord été comparés entre les espèces *J. rossii* et *J. fragrans*. Les résultats indiquent des différences significatives de bouquet floral et de taille d'éperon entre les deux espèces, correspondant certainement à deux syndromes différents. L'observation des pollinisateurs de chaque espèce confirme que les syndromes observés correspondent aux pollinisateurs effectifs. Cela suggère donc une adaptation de chaque espèce à sa faune pollinisatrice. Cependant, pour prouver qu'il s'agit d'un cas de spéciation écologique par les pollinisateurs, il serait nécessaire de confirmer que la divergence de syndromes de pollinisation est adaptative. Cela peut être abordé par une approche descriptive ou une approche expérimentale. Dans l'approche descriptive, l'adaptation locale est mise en évidence lorsque la distribution géographique des espèces de plantes étudiées est corrélée à celle de leurs différents pollinisateurs (e.g. Anderson & Johnson 2008; Peter & Johnson 2014). Cet aspect n'a pas été directement étudié. Cependant, les données disponibles sur la distribution des espèces de pollinisateurs observés indiquent que le sphinx *Agrius convolvuli*,

pollinisateur de *J. fragrans*, n'est pas cantonné aux habitats de basse altitude (Guillermet, données non publiées ; Martiré & Rochat 2008). Inversement, deux des pollinisateurs observés de *J. rossii* sont aussi présents dans les habitats de *J. fragrans*. Dans l'approche expérimentale, un effet significatif de l'interaction espèce x environnement sur le succès reproducteur après transplantation réciproque constitue la meilleure preuve d'adaptation locale à la faune pollinisatrice (e.g. Agren & Schemske 2012; Boberg *et al.* 2014). Cette approche constitue une perspective de recherche à envisager chez le faham mais semble difficile à mettre en place. En effet, afin de limiter les dégâts sur les racines des individus à transplanter, il est préférable de couper la branche de l'hôte sur laquelle ils reposent (Morales *et al.* 2010). D'autre part, il est préférable d'émasculer les transplants afin d'éviter la pollution génétique des populations d'accueil, ce qui permet de ne mesurer que le succès reproducteur femelle. Enfin, le succès reproducteur semble trop faible et trop variable entre les saisons (Blambert *et al.*, en préparation) pour pouvoir détecter significativement d'éventuelles différences entre les transplants et les populations d'accueil.

A l'échelle intraspécifique, chez *J. rossii*, les résultats indiquent une légère différenciation de la morphologie florale selon le type d'habitat sans variation du bouquet floral. Dans ce cas, il est possible d'imaginer que les espèces de pollinisateurs soient différentes selon l'habitat (notamment par la taille de trompe) mais qu'elles appartiennent au même groupe fonctionnel (Noctuidae) et soient donc attirées par les mêmes bouquets floraux (e.g. van der Niet *et al.* 2014; Cosacov *et al.* 2014). Cependant, l'hypothèse d'un changement de pollinisateur entre habitats comme origine de la divergence apparaît peu probable car les espèces pollinisatrices observées ont une aire de répartition qui couvre celle de *J. rossii* (Guillermet, données non publiées ; Martiré & Rochat 2008).

L'isolement reproducteur a été estimé par la mesure indirecte des flux de gènes en utilisant des marqueurs génétiques neutres de type microsatellites nucléaires. Ces

marqueurs ont permis d'évaluer le flux de gènes entre les espèces mais aussi entre les populations au sein de chaque espèce. Ils permettent donc d'estimer l'isolement reproducteur effectif entre les populations étudiées mais ne permettent pas d'identifier les types d'isolement impliqués. Aux échelles inter et intraspécifique, les résultats montrent que la divergence de traits floraux liés à la pollinisation correspond à la divergence génétique neutre révélant ainsi un patron d'isolement par l'adaptation. Ce patron est une prédiction directe de la spéciation écologique car selon ce mode de spéciation, la sélection divergente est à l'origine de la réduction du flux de gènes entre les populations adaptées aux différents environnements (ici les pollinisateurs) (Nosil 2012; Shafer & Wolf 2013). Ainsi, pour un degré d'isolement géographique donné, les populations adaptées à différents pollinisateurs doivent subir une plus forte réduction de flux de gènes et donc une plus forte différenciation génétique que les populations adaptées au même pollinisateur. Par exemple, les populations de *J. rossii* et *J. fragrans* de Basse-Vallée sont équidistantes de la population de *J. fragrans* de Mare-Longue (environ 3 km). Cependant la population de *J. rossii* est fortement différenciée de celle de Mare-Longue ($G'_{ST} = 0,887$) alors que celle de *J. fragrans* n'est significativement pas différenciée de cette même population.

Pour résumer, les résultats confirment une divergence de syndrome de pollinisation entre les espèces (traits attractifs et traits mécaniques) probablement due à un changement de pollinisateurs et partiellement responsable de l'isolement reproducteur mesuré. Chez *J. rossii*, il y a une légère divergence uniquement de certains traits morphologiques entre les habitats, associée à un léger isolement reproducteur. Cependant, les divergences inter et intraspécifique sont aussi associées à des changements d'habitat. Les données disponibles sur la distribution géographique des pollinisateurs semblent indiquer que ceux-ci ne sont pas cantonnés à un seul habitat. Dès lors, il est probable que l'interaction plante-pollinisateur ne soit pas la cause ultime de la divergence mais une conséquence indirecte.

6.2.2. Le rôle des autres facteurs liés à l'habitat

Différents facteurs environnementaux, biotiques et abiotiques, peuvent être à l'origine de la divergence adaptative entre habitats. Peu importe le facteur à l'origine, l'adaptation à différents habitats entraîne automatiquement un isolement écogéographique par contre sélection des migrants et des hybrides (Nosil *et al.* 2005; Sobel *et al.* 2010). Chez *J. rossii*, l'adaptation aux différents habitats est suggérée par le patron d'isolement par l'environnement. En effet, les différences environnementales entre populations expliquent deux fois plus le patron de différenciation génétique que les distances géographiques alors que ces deux variables explicatives sont indépendantes. De la même manière la divergence entre *J. rossii* et *J. fragrans* est associée à un changement d'habitat. Cependant, la simple corrélation entre différenciation génétique et différences écologiques ne permet pas à elle seule de déterminer le lien de cause à effet (Rundle & Nosil 2005). Par exemple, si la capacité de flux de gènes du clade étudié est faible par rapport à son aire de répartition, il peut y avoir différenciation génétique des populations de différents habitats sans rôle de la sélection divergente (Stelkens & Seehausen 2009; Thibert-Plante & Hendry 2010). Cependant, chez les orchidées, une revue récente et exhaustive des études de génétique des populations semble indiquer que la différenciation entre populations est généralement faible et qu'en deçà de 250 km, les flux de gènes entre populations sont trop importants pour permettre leur différenciation (Phillips *et al.* 2012). Les résultats obtenus chez le faham suggèrent donc un mécanisme qui limite les flux de gènes entre populations de différents habitats malgré la faible distance géographique les séparant. L'isolement écogéographique issu de l'adaptation locale est une hypothèse probable mais ce n'est pas la seule. L'adaptation à différents habitats chez le faham provoquerait aussi un isolement temporel partiel observé par le décalage de la floraison le long du gradient altitudinal.

Les différences écologiques entre habitats peuvent affecter indirectement les interactions mutualistes. Par exemple, les variations de composition des communautés végétales entre les habitats peuvent modifier les relations de compétition interspécifique pour l'accès aux pollinisateurs (Armbruster & Muchhala 2009). Lorsque cette compétition n'entraîne pas la réduction du taux de visites, la sélection divergente favorise le déplacement des caractères morphologiques floraux qui permet l'utilisation de différentes parties du corps de la même espèce de pollinisateur pour le transfert de pollen (Armbruster *et al.* 1994). Ce mécanisme pourrait expliquer la variation de la longueur de l'épéron entre habitats chez *J. rossii* sans variation du bouquet floral. Lorsque la compétition interspécifique pour les pollinisateurs réduit le taux de visites ou lorsque le déplacement de caractères est limité par d'autres contraintes, la sélection divergente favorise le changement de pollinisateur (Armbruster 1985). Dans les deux cas, cela peut aboutir à un isolement sexuel entre les populations situées dans différents habitats. D'autre part, l'adaptation à différents habitats peut entraîner un isolement temporel par décalage phénologique de la floraison (Grant 1981; Savolainen *et al.* 2006; Lowry *et al.* 2008b). Dans certains cas, le décalage de floraison peut provoquer un changement de pollinisateur. Par exemple, lorsque ce décalage provoque la non synchronisation entre la floraison et l'activité des pollinisateurs d'origine (Peter & Johnson 2014).

Enfin, l'interaction avec les partenaires mycorhiziens peut probablement favoriser la spéciation écologique chez les orchidées, de la même manière que l'interaction plante-pollinisateur présentée dans le chapitre précédent. Premièrement, des champignons mycorhiziens différents peuvent être des agents de sélection divergente. En effet, les partenaires fongiques influent directement sur la valeur sélective des orchidées car ils sont nécessaires à leur germination et leur croissance (Smith & Read 1997; Rasmussen 2002). De plus, des expériences menées *in vitro* sur *Tolumnia variegata* montrent que la capacité de germination et de développement de l'orchidée varie selon l'espèce de champignon et varie entre individus pour la même espèce de

champignon (Otero *et al.* 2005). Deuxièmement, différentes études sur des orchidées mycohétérotrophiques ont montré que des espèces sœurs ayant récemment divergé et vivant en sympatrie sont associées à différents partenaires mycorhiziens suggérant un rôle des mycorhizes dans la divergence (Taylor & Bruns 1999; Taylor *et al.* 2003). Cependant, ce mode de vie particulier rend les orchidées complètement dépendantes du champignon pour assurer leur nutrition. Il apparaît donc difficile de généraliser ce résultat d'autant plus que Waterman *et al.* (2011) ont montré par une approche phylogénétique sur 59 espèces de la tribu des Deseae que la divergence entre espèces sœurs est souvent associée à un changement de pollinisateur et jamais à un changement de partenaire mycorhizien. Chez le faham, la seule étude disponible indique que *J. rossii* est généraliste avec huit clades de partenaires mycorhiziens identifiés. *J. fragrans* semble spécialisée avec un seul clade commun à *J. rossii* (Martos *et al.* 2012). Cependant, cette étude a été menée sur de nombreuses espèces d'orchidées réunionnaises et son échantillonnage n'est pas adapté pour conclure à l'échelle populationnelle. En outre, seuls les champignons associés au stade adulte ont été pris en compte lors de cette étude alors que dans certains cas, les cortèges mycorhiziens sont plus restreints au stade protocorme en comparaison des stades germinatif et adulte (Bidartondo & Read 2008). Il serait donc intéressant de mener des expériences de semis de graines *in situ* afin d'inventorier les cortèges mycorhiziens aux différents stades de développement chez dans les différents habitats de *J. fragrans* et *J. rossii*. Ce même type d'expérience pourrait aussi être utilisé pour tester expérimentalement la sélection contre les migrants au stade germinatif en comparant les taux de germination des graines issues de croisements entre individus de l'habitat avec ceux des graines issues de croisements entre individus des autres habitats.

6.2.3. Les modes de spéciation alternatifs

Globalement, les résultats sont en accord avec un mode de spéciation écologique chez le faham. En effet, toutes les hypothèses permettant d'expliquer la divergence des traits adaptatifs impliquent de la sélection divergente. Cela permet de rejeter l'hypothèse de spéciation par mutation (voir chapitre 1.1.7). Cependant, cette étude ne permet pas d'affirmer que la divergence des espèces et des populations de *J. rossii* est effectivement liée à de la sélection divergente. Des tests expérimentaux des rôles sélectifs des pollinisateurs et des différents types d'habitats sont envisageables comme perspectives de recherche. La spéciation par hybridation et polyploïdation apparaît peu probable car si les individus polyploïdes auraient été détectés lors du génotypage des échantillons. Enfin le mode de spéciation uniquement par dérive génétique semble peu probable chez le faham car les traits identifiés comme intervenant dans l'isolement reproducteur sont probablement soumis à sélection. Cependant, chez les orchidées, la reproduction semble fortement limitée par la disponibilité des pollinisateurs (Tremblay *et al.* 2005) et la germination fortement limitée par la disponibilité du partenaire mycorhizien (Calvo 1993; Rasmussen 2002). La combinaison de ces deux facteurs contribue ainsi fortement à la petite taille des populations d'orchidées et aux faibles taux de migration, ce qui représente des conditions favorables à la dérive génétique entre populations (Otero *et al.* 2004; Tremblay *et al.* 2005; Waterman & Bidartondo 2008). C'est à partir de ce constat que le modèle d'évolution des orchidées par dérive-sélection a été proposé (Figure 6.1 ; Tremblay *et al.* 2005). Dans un premier temps, la dérive génétique provoque la différenciation génétique entre les populations. Ainsi, lors d'un événement de colonisation d'un nouveau milieu par quelques individus, la dérive peut provoquer d'importants changements phénotypiques par la mise en place de nouvelles combinaisons génétiques (Templeton 2008). Les individus présentant ces combinaisons nouvelles peuvent présenter des phénotypes très différents des phénotypes d'origine et, par exemple, ne plus être parfaitement adaptés à leur

pollinisateur d'origine. Dans ce cas, s'il existe dans le milieu colonisé un autre pollinisateur permettant d'assurer la reproduction de ces individus, ils seront alors favorisés par sélection naturelle. Les individus les plus proches de la population d'origine seront contre sélectionnés. De cette manière, la dérive et la sélection naturelle agiraient en synergie en favorisant la divergence des populations.

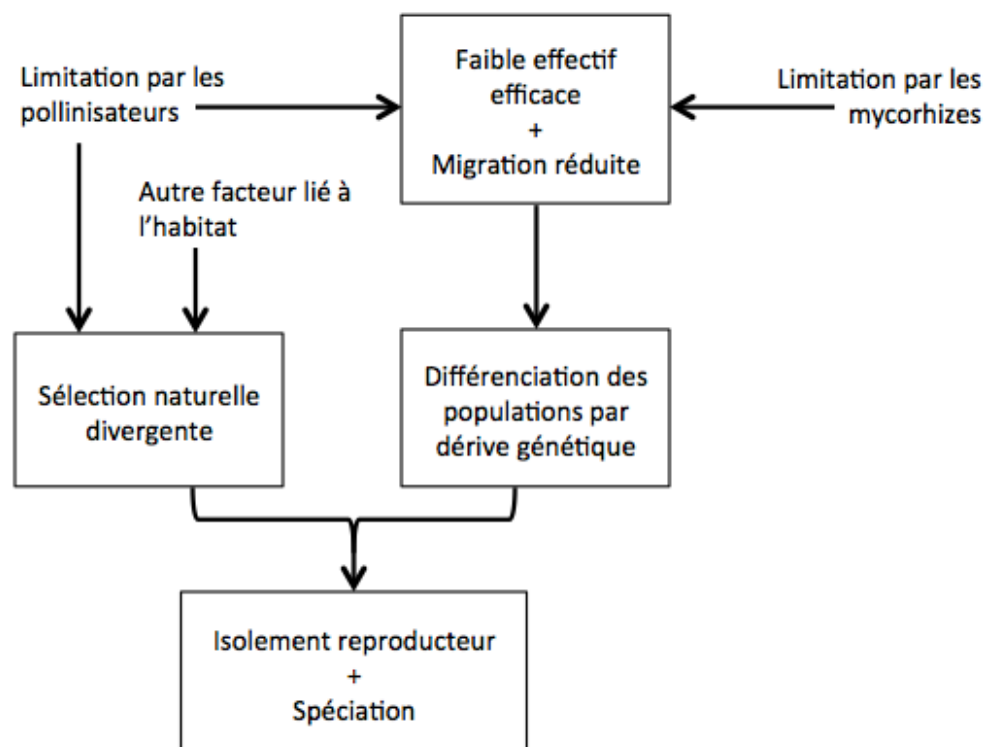


Figure 6.1. Représentation schématique du modèle de spéciation des orchidées par dérive-sélection de Tremblay *et al.* (2005)

Chez *J. rossii*, les résultats indiquent que les conditions démographiques (effectif efficace moyen de 32 individus et taux de migration inférieurs à 1 individu par génération) sont favorables à la dérive. Par exemple, la population de Bélouve, qui est isolée génétiquement sans divergence phénotypique, représente probablement un cas de divergence par dérive génétique. Concernant *J. rossii* et *J. fragrans*, les conditions géographiques lors de leur divergence ne sont pas connues. Aucun élément ne permet de dire si les espèces ont divergé en étant chacune sur une île différente (Réunion et Maurice) ou sur la même île (Réunion ou Maurice). Dans le premier cas,

un évènement fondateur associé à l'isolement par la barrière océanique a pu favoriser la divergence. Dans le deuxième cas, certaines populations auraient pu se retrouver fortement isolées pour des raisons géologiques ou climatiques. En effet, la combinaison du volcanisme intense, de l'érosion et des mouvements géologiques a provoqué la mise en place de véritables 'îles' géologiques à l'intérieur des îles, à la fois à la Réunion et à Maurice (Duncan 2009 ; Thébaud *et al.* 2009). De plus, des fluctuations climatiques historiques ont également pu induire des variations dans l'aire de répartition des populations. Rijdsdijk *et al.* 2009 ont montré que d'importantes fluctuations climatiques ont eu lieu à Maurice (et donc dans la zone géographique des Mascareignes) par le passé, entraînant de longues périodes de sécheresse qui ont parfois induit d'important changement dans les communautés forestières (de Boer *et al.* 2013). Si ces épisodes volcaniques et climatiques ont perduré dans le temps, certaines populations ont pu se retrouver réduites en taille et isolées dans des localités plus clémentes. La dérive génétique favoriser la différenciation des populations isolées. Par exemple, une étude récente sur un oiseau endémique de la Réunion, *Coracina newtoni*, en danger critique d'extinction, a montré que cette espèce a subi un sévère goulot d'étranglement il y a environ 5000 ans, probablement dû à la période de chaleur et de sécheresse que la zone a connu à cette époque (Salmona *et al.* 2012).

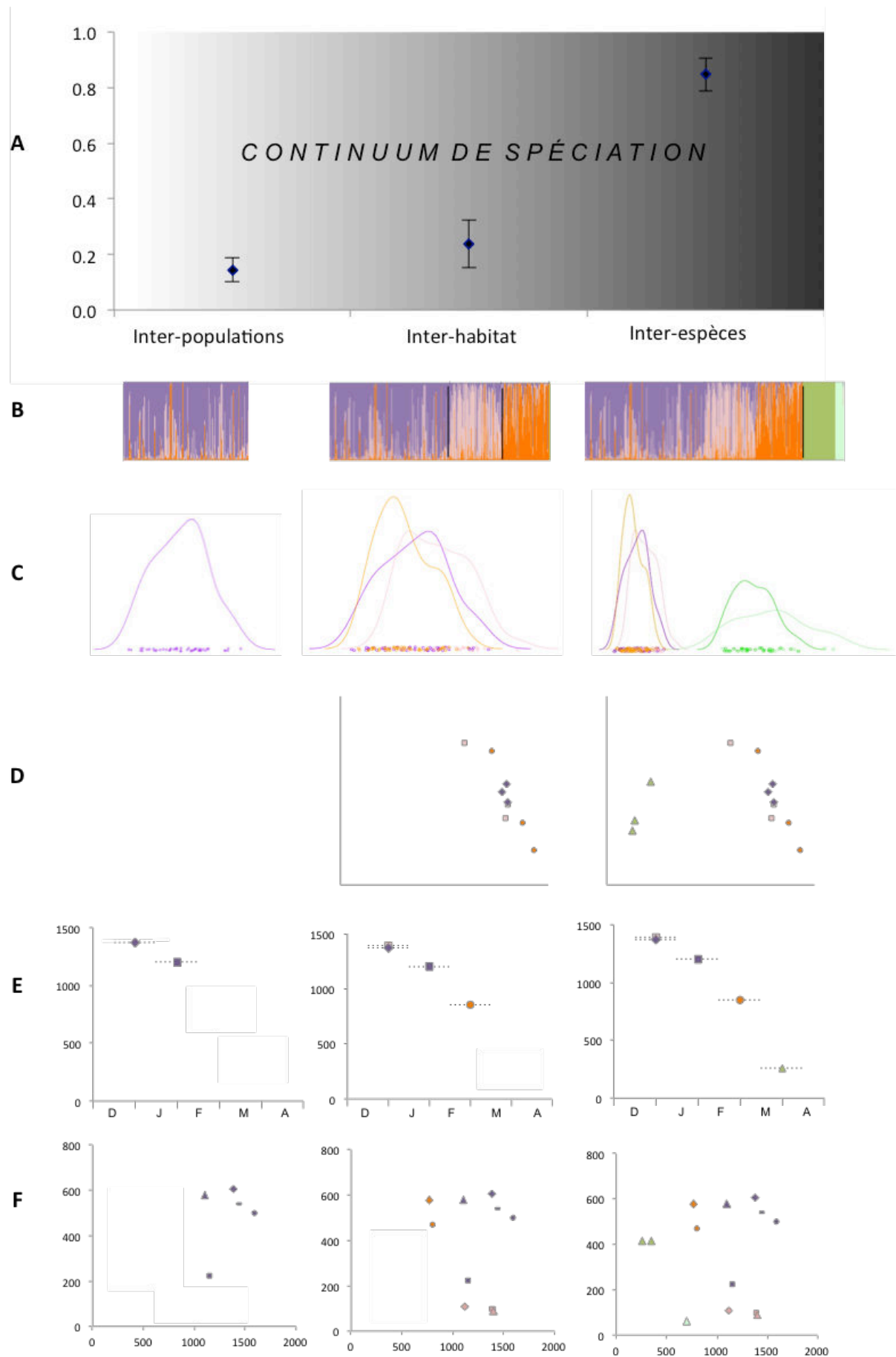


Figure 6.2. Schéma synthétique des principaux résultats (A) G'_{ST} moyens entre paires de populations issues du même habitat, d'habitats différents ou d'espèces différentes. (B) Analyse discriminante des composantes principales testant le regroupement génétique des individus selon leur type d'habitat d'origine. (C) Densité de distribution de la longueur de l'éperon. (D) Positionnement multidimensionnel non métrique (NMDS) des individus en fonction du pourcentage relatif des composés chimiques de leur bouquet floral. (E) Phénologie de la floraison des populations estimée en fonction de l'altitude. Les points correspondent aux observations et les traits représentent la durée estimée de la floraison. (F) Répartition des populations en fonction de l'altitude et du quotient pluviothermique d'Emberger. (B-F) Les couleurs correspondent aux différents types d'habitats.

6.3. Le continuum de spéciation et les facteurs affectant sa progression

Il est difficile de prouver de manière directe la nature progressive des transitions depuis des populations panmictiques vers des écotypes puis vers différentes espèces dans un même système d'étude; d'autant plus lorsque le temps de génération du modèle étudié est important (Nosil 2012). Souvent, le seul moyen de mettre en évidence la nature continue de la divergence est indirect. Par exemple, il est possible de comparer la différenciation des populations au sein d'un même écotpe à celle existant entre populations de différents écotypes et de différentes espèces ayant récemment divergé (Nosil *et al.* 2009). Pour que cette méthode soit efficace, il est préférable de travailler sur des lignées proches qui diffèrent dans leur degré d'isolement reproducteur. Cependant, cette approche ne représente pas directement le déroulement dans le temps de la spéciation notamment à cause des circonstances propres à l'isolement de chaque lignée (Nosil 2012).

Les résultats obtenus chez le faham semblent confirmer cette nature continue de la divergence. Ainsi, l'intensité de l'isolement reproducteur effectif entre les populations, mesurée par la différenciation génétique neutre, est faible à l'intérieur des habitats, intermédiaire entre différents habitats et forte entre les espèces. Ces trois situations peuvent être considérées comme trois étapes différentes le long du continuum de spéciation (Figure 6.2A). De cette manière, il est possible d'identifier les facteurs

responsables des transitions entre ces étapes et donc responsables de la progression de la spéciation dans le modèle étudié (Hendry *et al.* 2009). Le premier résultat important est la structuration génétique neutre liée à l'habitat aux niveaux intra et interspécifique qui indique que la réduction progressive du flux de gènes entre populations est toujours accompagné d'un changement d'habitats (Figure 6.2B). Le deuxième résultat important est que la différenciation génétique entre les populations de différents habitats et entre les populations de différentes espèces s'accompagnent respectivement d'une légère et d'une forte divergence des traits morphologiques floraux pouvant intervenir dans l'attraction visuelle (largeur du labelle) et dans l'efficacité des pollinisateurs (longueur de l'épéron ; Figure 6.2C). En revanche, seules les populations de différentes espèces divergent dans la composition du bouquet floral (Figure 6.2D). Autrement dit, les populations d'un même habitat présentent une distribution unimodale des caractères adaptatifs sans isolement reproducteur. Les populations d'habitats différents présentent une distribution non unimodale avec chevauchement des caractères adaptatifs accompagnée d'un faible isolement reproducteur. Les populations d'espèces différentes présentent une distribution bimodale sans chevauchement des caractères adaptatifs associée à un fort isolement reproducteur, probablement réversible. Ces trois cas correspondent respectivement aux étapes 1, 2 et 3 définies par Hendry (2009) le long du continuum de spéciation (voir chapitre 1.1.2). Dans ce cadre, il est possible d'identifier les facteurs potentiellement responsables des transitions entre les étapes du continuum de spéciation chez le faham.

La transition entre l'étape 1 et l'étape 2 semble principalement due à la colonisation d'habitats différents. Nos résultats ne permettent pas de déterminer la part relative de la dérive génétique et de l'adaptation locale dans la divergence des populations entre habitats mais suggèrent un rôle probable des deux facteurs. En s'appuyant sur le modèle de sélection-dérive (Figure 6.1), il est possible d'imaginer un scénario dans

lequel la dérive génétique favorise la divergence en permettant à la sélection divergente de s'exprimer, notamment sur des traits responsables de la mise en place d'un isolement reproducteur partiel. Le type d'isolement reproducteur intervenant à ce stade chez le faham reste inconnu. L'isolement sexuel directement lié à la sélection par les pollinisateurs semble peu probable. L'isolement écogéographique dû à l'adaptation locale aux conditions environnementales pourrait être impliqué. malgré des flux de gènes restent relativement conséquents. La transition entre l'étape 2 et l'étape 3 est principalement marquée par un changement de pollinisateur en plus du changement d'habitat. Cependant, il est impossible d'affirmer que l'isolement sexuel résultant de ce changement de pollinisateur est responsable à lui seul de la transition entre les étapes 2 et 3 et donc de la réduction importante du flux de gènes observé entre les espèces. Les espèces ont en effet pu divergé en allopatrie stricte, chacune sur une île différente. Une étude phylogéographique du clade pourrait permettre de déterminer les conditions géographiques lors de la divergence ainsi que le temps écoulé depuis la divergence.

De manière générale, les résultats révèlent l'importance des barrières aux flux de gènes intervenant avant la reproduction (isolements écogéographique, temporel, sexuel) dans la mise en place de l'isolement reproducteur observé entre *J. rossii* et *J. fragrans*. Les types d'isolement reproducteur qui agissent tôt dans le cycle de vie peuvent potentiellement réduire fortement le flux de gènes en comparaison de ceux qui agissent plus tard et peuvent seulement limiter les flux de gènes restants (Coyne & Orr 2004). Chez les plantes à fleurs, les barrières prézygotiques participent deux fois plus à l'isolement reproducteur total que les barrières postzygotiques (Lowry *et al.* 2008a). Parmi ces barrières prézygotiques, l'isolement écogéographique joue un rôle prépondérant dans de nombreux cas (Ramsey *et al.* 2003; Lowry *et al.* 2008a; Sobel *et al.* 2010; Schamske 2010).

6.4. Implications des résultats en terme et de conservation

Le faham est une orchidée emblématique et patrimoniale, endémique des Mascareignes et connue pour ses propriétés médicinales, pour la confection de rhums arrangés, et pour la parfumerie (du Petit-Thouars 1822; Dorvault 1886; Lavergne 1990; Shum Cheong Sing *et al.* 1992). Néanmoins, cette orchidée ne bénéficie d'aucun statut de protection particulier en dehors de l'inscription à l'Annexe II de la Convention sur le Commerce International des Espèces de faune et de flore Sauvages menacées d'extinction (CITES). L'utilisation continue de cette ressource naturelle pour alimenter les marchés forains et la grande distribution menace probablement de nombreuses populations naturelles dont la régression a pu être observée dans certaines localités (Pailler com. pers.). Aussi, afin de permettre la conservation de cette ressource naturelle tout en favorisant son utilisation et sa valorisation économique, un projet de mise en place d'une filière de production végétale du faham est actuellement mené dans le cadre d'un partenariat entre l'Université de la Réunion et la Distillerie J. Chatel.

6.4.1. Révision de la taxinomie

Les cadres conceptuels de la spéciation écologique et du continuum de spéciation permettent de s'affranchir des problèmes liés à la définition de l'espèce en se focalisant sur les mécanismes à l'origine de la divergence. Cependant, les catégories taxinomiques d'espèces et de sous-espèces restent largement utilisées dans la mise en place d'actions de conservation (Dubois 2003; Green 2005). La catégorie 'espèce' est notamment importante car (1) elle permet l'inscription sur une liste d'espèces menacées ou protégées (Rodrigues *et al.* 2006); (2) elle est souvent utilisée pour évaluer la biodiversité et son évolution sur un territoire donné (Possingham *et al.* 2002); et (3) elle est à la base de la mise en œuvre de plans de conservation et des aires protégées (Margules & Pressey 2000). La catégorie 'sous-espèce' est utilisée car

les mesures concrètes de gestion sont réalisées à l'échelle des populations et doivent nécessairement prendre en compte la diversité intraspécifique (Frankham *et al.* 2009). Face à la remise en cause de la validité du concept de sous-espèce et à l'indétermination du concept d'espèce, le concept d'Unités Évolutives Significatives (UES) a été créé (Ryder 1986). Dans sa définition la plus large, une UES regroupe les populations d'un taxon dont la divergence évolutive par rapport aux autres populations de ce même taxon peut être évaluée (Fraser & Bernatchez 2001). Il s'agit donc d'identifier les mécanismes évolutifs à l'origine la diversité génétique intraspécifique dans le but de conserver le potentiel évolutif du taxon étudié (Crandall *et al.* 2000; Moritz 2002). De nombreuses définitions d'UES et de méthodes de détermination ont été proposées (revues dans Fraser & Bernatchez 2001). Finalement, ce concept semble pâtir des mêmes problèmes de définition que celui de l'espèce et n'est pas utilisé dans les actions de conservation (Green 2005). Il apparaît donc nécessaire de concilier l'approche des UES qui permet de prendre en compte le potentiel évolutif avec l'approche taxinomique traditionnelle qui permet la mise en application pratique des actions de conservation. Concrètement, il s'agit de déterminer les UES en utilisant la méthode la plus intégrative (Crandall *et al.* 2000; Fraser & Bernatchez 2001) et de décrire ces UES en tant que sous-espèces pour un transfert vers les gestionnaires.

En terme de taxinomie, les résultats de la thèse indiquent que le faham est représenté par deux espèces précédemment décrites *Jumellea fragrans* (Thouars) Schltr. que l'on pourrait appeler communément le faham des bas et *J. rossii* Senghas, le faham des hauts. Cette distinction taxinomique en deux espèces différentes semble valide d'un point de vue biologique d'une part car les deux espèces de faham constituent deux entités génétiques isolées reproductivement (bien que l'isolement semble potentiellement réversible) mais aussi car ces espèces occupent des niches écologiques différentes. La distinction entre les espèces apparaît donc nécessaire d'une part pour l'évaluation de leur risque d'extinction respectif mais aussi en vue de leur

valorisation. En effet, de par leur divergence adaptative et leur distribution qui en résulte, les deux espèces ne nécessitent probablement pas les mêmes conditions abiotiques pour leur croissance et ne présentent peut être pas les mêmes propriétés aromatiques. La caractérisation métabolomique et l'étude agro-écologique réalisées en vue de la mise en place d'une filière de production doivent donc être menées séparément sur chacune des espèces (thèse CIFRE en cours ; Blambert, Université de la Réunion, Distillerie J. Chatel).

D'autre part, l'étude des patrons de variation morphologique et génétique à l'échelle du complexe du faham révèle que l'espèce *J. fragrans* semble regrouper deux unités évolutives distinctes. Ces deux unités sont isolées reproductivement et pourraient être adaptées à deux types d'habitats différents, d'une part la forêt semi-sèche (populations de l'ouest de la Réunion et de Maurice) et d'autre part la forêt humide de basse altitude (populations de l'est de la Réunion). Cependant, il est difficile d'affirmer que l'isolement reproducteur résulte de l'adaptation locale car les populations sont fortement isolées géographiquement, ce qui peut être à l'origine de la réduction de flux de gènes entre ces populations. D'autre part, les habitats dans lesquels se retrouvent ces populations (basse et moyenne altitude) ont été les premiers impactés suite à l'arrivée de l'homme sur l'île et sont de ce fait fortement fragmentés, ce qui peut accentuer l'isolement génétique (Strasberg *et al.* 2005). Les résultats préliminaires de structuration génétique de l'ADN chloroplastique (région non codante *petA-psbJ*, données non présentées) suggèrent que la divergence entre les deux unités évolutives de *J. fragrans* est ancienne, ce qui indiquerait qu'elle ne serait pas d'origine anthropique. En utilisant l'ensemble des données disponibles et en appliquant la méthodologie de Crandall *et al.* (2000), ces deux unités semblent devoir être gérées séparément comme s'il s'agissait de deux espèces distinctes. Il serait donc utile de décrire deux sous-espèces différentes de *J. fragrans* afin que les deux unités

évolutives soient prises en compte dans les actions de conservation, notamment dans l'évaluation du risque d'extinction.

6.4.2. Recommandations de gestion

En appliquant la méthode de Crandall *et al.* (2000) au cas du faham, les trois unités évolutives précédemment déterminées devraient être gérées comme s'il s'agissait d'espèces distinctes. Les risques d'extinction ont donc été déterminés pour chaque unité évolutive à partir des données relatives à la transformation de leur habitat depuis la colonisation de l'île par l'homme (Strasberg *et al.* 2005).

Concernant *J.rossii*, les habitats de la Réunion dans lesquels l'espèce est présente (forêts de moyenne altitude de la côte au vent et de montagne) ont été relativement peu affectés par l'activité humaine et sont aujourd'hui pour la plupart inclus dans le cœur du parc national. En outre, les observations de terrains réalisées pendant cette thèse et les résultats de nombreuses prospections à l'échelle de l'île (Jacquemyn *et al.* 2007) indiquent que cette espèce est fréquente et localement abondante. D'après ces éléments, *J. rossii* pourrait être classée dans la catégorie 'Préoccupation mineure' (LC) de l'UICN. A Maurice, cette espèce est considérée comme 'Éteinte' (EX) (Baider *et al.* 2012).

J. fragrans regroupe deux unités évolutives devant être traitées comme des espèces distinctes. Il est donc nécessaire de considérer séparément les populations de forêt humide de basse altitude et les populations de forêt semi-sèche. Les deux types de forêt ont fortement régressé du fait de l'agriculture et l'urbanisation. L'estimation de la réduction en surface de ces habitats est telle que de nombreuses populations de *J. fragrans* ont probablement disparu. Aujourd'hui, l'unité évolutive de forêt humide de basse altitude se retrouve principalement dans le sud-est de l'île au sein de la réserve naturelle de Mare-Longue (intégrée au cœur du parc national) où elle est relativement abondante, notamment dans les parcelles de forêt secondaire. Les prospections

réalisées dans les autres reliques naturelles de ce type d'habitat n'ont pas permis d'identifier de population supplémentaire. Seuls quelques individus isolés ont été relevés. Bien que cette unité évolutive soit principalement présente en zone protégée, la réduction et la fragmentation de son habitat ont probablement eu des conséquences néfastes sur sa biologie et sont peut être à l'origine de la faible diversité génétique observée en comparaison de *J. rossii* mais aussi en comparaison d'autres orchidées allogames (Gustafsson & Sjögren-Gulve 2002; Pellegrino *et al.* 2005; Swarts *et al.* 2009). L'intensité de la réduction de la superficie de son habitat suggère de classer cette forme de faham dans la catégorie '*Vulnérable*' (VU) de l'UICN. D'autre part, en raison de la confusion taxonomique avec *J. rossii*, cette espèce est probablement récoltée pour être utilisée sous forme d'infusion ou de macération dans le rhum. Il apparaît donc nécessaire non seulement de sensibiliser le public sur la différence entre les deux espèces mais aussi de comparer leur composition chimique car *J. fragrans* n'a peut être pas les mêmes propriétés que *J. rossii*.

Concernant la seconde unité évolutive de *J. fragrans*, présente en forêt semi-sèche, la situation est plus préoccupante. Seuls quelques individus isolés et une population de 15 individus sont connus et son habitat est l'un des plus impactés par les activités humaines. Cette forme de faham pourrait donc être classée '*En danger*' (EN). La forêt semi-sèche fait actuellement l'objet d'actions de reconstitution et de restauration écologiques dans le cadre du programme Life + Corexerun piloté par le parc national de la Réunion. Dans ce cadre, il serait envisageable d'orienter les travaux actuels sur la germination et la culture *ex situ* du faham (thèse CIFRE en cours ; Blambert, Université de la Réunion, Distillerie J. Chatel) vers des actions de réintroduction en milieu naturel en parallèle du projet Corexerun, de renforcement des populations connues et de mise en collection *ex situ* en profitant des compétences du centre de ressources biologiques Vatel sur la culture des vanilliers.

7

Références bibliographiques

- Abbott I, Abbott L, Grant P (1977) Comparative ecology of Galapagos ground finches (*Geospiza Gould*): evaluation of the importance of floristic diversity and interspecific competition. *Ecological Monographs*, **47**, 151–184.
- Ackerman JD, Sabat A, Zimmerman JK (1996) Seedling establishment in an epiphytic orchid: an experimental study of seed limitation. *Oecologia*, **106**, 192–198.
- Ackerman JD, Zimmerman JK (1994) Bottlenecks in the life histories of orchids: resources, pollination, population structure, and seedling establishment. In: *Proceedings of the 14th World Orchid Conference* (ed Pridgeon A), pp. 125–129. London.
- Adams RP (2001) *Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy*. (RP Adams, Ed.). Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL.
- Agren J, Schemske DW (2012) Reciprocal transplants demonstrate strong adaptive differentiation of the model organism *Arabidopsis thaliana* in its native range. *New Phytologist*, **194**, 1112–22.
- Anderson B, Johnson SD (2008) The geographical mosaic of coevolution in a plant-pollinator mutualism. *Evolution*, **62**, 220–5.
- Arditti J (1992) *Fundamentals of orchid biology*. John Wiley & Sons, New-York.
- Arditti J, Ghani AKA (2000) Tansley Review No. 110. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytologist*, **145**, 367–421.
- Armbruster W (1985) Patterns of character divergence and the evolution of reproductive ecotypes of *Dalechampia scandens* (Euphorbiaceae). *Evolution*, **39**, 733–752.
- Armbruster WS, Edwards ME, Debevec EM (1994) Floral character displacement generates assemblage structure of western australian triggerplants (*Stylidium*). *Ecology*, **75**, 315.
- Armbruster WS, Muchhala N (2009) Associations between floral specialization and species diversity: cause, effect, or correlation? *Evolutionary Ecology*, **23**, 159–179.
- Austin JJ, Arnold EN, Jones CG (2004) Reconstructing an island radiation using ancient and recent DNA: the extinct and living day geckos (*Phelsuma*) of the Mascarene islands. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **31**, 109–22.
- Baider C, Florens F, Baret S *et al.* (2010) Status of plant conservation in oceanic islands of the Western Indian Ocean. In: *Proceedings of the 4th Global Botanic Gardens Congress*, pp. 1–7.
- Baider C, Florens FBV, Rakotoarivelo F, Pailler T (2012) Two new records of *Jumellea* (Orchidaceae) for Mauritius (Mascarene Islands) and their conservation status. *Phytotaxa*, **52**, 21–28.
- Baker HG (1955) Self-compatibility and establishment after “long-distance” dispersal. *Evolution*, **9**, 347–349.
- Barrett SCH (1996) The reproductive biology and genetics of island plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **351**, 725–733.
- Benke M (2004) *La Réunion des orchidées sauvages*. Mabé, Saint-Denis de la Réunion.

- Bidartondo MI, Read DJ (2008) Fungal specificity bottlenecks during orchid germination and development. *Molecular Ecology*, **17**, 3707–16.
- Boberg E, Alexandersson R, Jonsson M *et al.* (2014) Pollinator shifts and the evolution of spur length in the moth-pollinated orchid *Platanthera bifolia*. *Annals of Botany*, **113**, 267–75.
- De Boer EJ, Hooghiemstra H, Vincent Florens FB *et al.* (2013) Rapid succession of plant associations on the small ocean island of Mauritius at the onset of the Holocene. *Quaternary Science Reviews*, **68**, 114–125.
- Bolnick DI, Nosil P (2007) Natural selection in populations subject to a migration load. *Evolution*, **61**, 2229–43.
- Bosser J (1987) Contribution à l'étude des Orchidaceae de Madagascar et des Mascareignes. XXII. *Adansonia*, 249–254.
- Bradshaw HD, Schemske DW (2003) Allele substitution at a flower colour locus produces a pollinator shift in monkeyflowers. *Nature*, **426**, 176–178.
- Brochmann C, Borgen L, Stabbetorp O (2000) Multiple diploid hybrid speciation of the Canary Island endemic *Argyranthemum sundingii* (Asteraceae). *Plant Systematics and Evolution*, **220**, 77–92.
- Butlin RK, Galindo J, Grahame JW (2008) Sympatric, parapatric or allopatric: the most important way to classify speciation? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **363**, 2997–3007.
- Cadet T (1977) La végétation de l'île de La Réunion: étude phytosociologique et phytoécologique. Université d'Aix-Marseille, France.
- Cadet T (1979) Notes sur les orchidées de l'île de La Réunion. *L'Orchidophile*, **10**, 1295–1308.
- Calvo RN (1993) Evolutionary demography of orchids: intensity and frequency of pollination and the cost of fruiting. *Ecology*, **74**, 1033–1042.
- Carlquist S (1974) *Island biology*. Columbia University Press, New-York & London.
- Carroll A, Pallardy S, Galen C (2001) Drought stress, plant water status, and floral trait expression in fireweed, *Epilobium angustifolium* (Onagraceae). *American Journal of Botany*, **88**, 438–446.
- Caruso C (2006) Plasticity of inflorescence traits in *Lobelia siphilitica* (Lobeliaceae) in response to soil water availability. *American Journal of Botany*, **93**, 531–538.
- Caujapé-Castells J, Tye A, Crawford DJ *et al.* (2010) Conservation of oceanic island floras: Present and future global challenges. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, **12**, 107–129.
- Chapuis MP, Estoup A (2007) Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, **24**, 621–631.
- Cheke A, Hume J (2008) *Lost land of the dodo*. T & AD Poyser, London.

- Van der Cingel N (2001) *An atlas of orchid pollination. America, Africa, Asia and Australia*. A. A. Balkema Publishers, Rotterdam.
- De Cordemoy EJ *Flore de l'île de la Réunion (phanérogames, cryptogames, vasculaires, muscinées) avec l'indication des propriétés économiques et industrielles des plantes*. Librairie des sciences naturelles, Paul Klincksieck, Paris.
- De Cordemoy EJ (1899) Révision des orchidées de La Réunion. *La Revue Générale de Botanique*, **11**, 409–429.
- Cosacov A, Cocucci AA, Sérsic AN (2014) Geographical differentiation in floral traits across the distribution range of the Patagonian oil-secreting *Calceolaria polyrhiza*: do pollinators matter? *Annals of Botany*, **113**, 251–66.
- Cox GW, Ricklefs RE (1977) Species diversity and ecological release in Caribbean land bird faunas. *Oikos*, **28**, 113–122.
- Coyne J, Orr H (1989) Patterns of speciation in *Drosophila*. *Evolution*, **43**, 362–381.
- Coyne JA, Orr H (2004) Speciation. In: *Speciation*, p. 545. Sinauer Associates, Inc., Sunderland.
- Crandall KA, Bininda-Emonds ORP, Mace GM, Wayne RK (2000) Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology & Evolution*, **15**, 290–295.
- Crawford DJ, Stuessy TF (1997) Plant speciation on oceanic islands. In: *Evolution and diversification in land plants* (eds Iwatsuki K, Raven PH), pp. 249–267. Springer-Verlag, Tokyo.
- Darwin C (1859) *The origin of species*. John Murray, London.
- Darwin C (1862) *On the Various Contrivances by Which British and Foreign Orchids Are Fertilised*. John Murray, London.
- Dempster AP, Laird NM, Rubin DB (1977) Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B*, **38**, 1–38.
- Dobzhansky T (1940) Speciation as a stage in evolutionary divergence. *The American Naturalist*, **74**, 312.
- Doebeli M, Dieckmann U (2000) Evolutionary branching and sympatric speciation caused by different types of ecological interactions. *The American Naturalist*, **156**, S77–S101.
- Dopman EB, Pérez L, Bogdanowicz SM, Harrison RG (2005) Consequences of reproductive barriers for genealogical discordance in the European corn borer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 14706–11.
- Dorken ME, Barrett SCH (2004) Phenotypic plasticity of vegetative and reproductive traits in monoecious and dioecious populations of *Sagittaria latifolia* (Alismataceae): a clonal aquatic plant. *Journal of Ecology*, **92**, 32–44.
- Dorvault F (1886) *L'officine, ou Répertoire général de pharmacie pratique*. Asselin, Paris, France.

- Dray S, Dufour A-B (2007) The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of Statistical Software*, **22**, 1–20.
- Drès M, Mallet J (2002) Host races in plant-feeding insects and their importance in sympatric speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **357**, 471–92.
- Dressler RL (1981) *The orchids, natural history and classification*. Harvard University Press, London.
- Dressler RL (1993) *Phylogeny And Classification Of The Orchid Family*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Dubois A (2003) The relationships between taxonomy and conservation biology in the century of extinctions. *Comptes Rendus Biologies*, **326**, 9–21.
- Duncan R (2009) Mascarene islands, geology. In: *Encyclopedia of islands* (eds Gillespie R, Clague D), pp. 620–622. University of California Press, Berkeley.
- Emberger L (1930) Sur une formule climatique applicable en géographie botanique. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences*, **191**, 389–390.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, **14**, 2611–2620.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, **131**, 479–491.
- Faubet P, Gaggiotti OE (2008) A new Bayesian method to identify the environmental factors that influence recent migration. *Genetics*, **178**, 1491–504.
- Fenster CB, Armbruster WS, Wilson P, Dudash MR, Thomson JD (2004) Pollination syndromes and floral specialization. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **35**, 375–403.
- Fitzpatrick BM, Fordyce JA, Gavrilets S (2008) What, if anything, is sympatric speciation? *Journal of Evolutionary Biology*, **21**, 1452–9.
- Fitzpatrick BM, Fordyce JA, Gavrilets S (2009) Pattern, process and geographic modes of speciation. *Journal of Evolutionary Biology*, **22**, 2342–7.
- Florens FBV (2013) Conservation in Mauritius and Rodrigues: Challenges and achievements from two ecologically devastated oceanic islands. In: *Conservation Biology: Voices from the tropics* (eds Raven PH, Sodhi NS, Gibson L), pp. 40–50. John Wiley & Sons.
- Frankham R (1998) Inbreeding and Extinction: Island Populations. *Conservation Biology*, **12**, 665–675.
- Frankham R, Ballou J, Briscoe D (2002) *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2004) *A Primer of Conservation Genetics*. Cambridge University Press.

- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2009) *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press.
- Frantz AC, Cellina S, Krier A, Schley L, Burke T (2009) Using spatial Bayesian methods to determine the genetic structure of a continuously distributed population: clusters or isolation by distance? *Journal of Applied Ecology*, **46**, 493–505.
- Fraser DJ, Bernatchez L (2001) Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. *Molecular Ecology*, **10**, 2741–2752.
- Funk DJ, Nosil P, Etges WJ (2006) Ecological divergence exhibits consistently positive associations with reproductive isolation across disparate taxa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 3209–13.
- Gao H, Williamson S, Bustamante CD (2007) A Markov Chain Monte Carlo approach for joint inference of population structure and inbreeding rates from multilocus genotype data. *Genetics*, **176**, 1635–51.
- Gillespie R, Croom H, Hasty G (1997) Phylogenetic relationships and adaptive shifts among major clades of *Tetragnatha* spiders (Araneae: Tetragnathidae) in Hawai'i. *Pacific science*, **51**, 380–394.
- Givnish T (2010) Ecology of plant speciation. *Taxon*, **59**, 1326–1366.
- Givnish TJ, Millam KC, Mast AR *et al.* (2009) Origin, adaptive radiation and diversification of the Hawaiian lobeliads (Asterales: Campanulaceae). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **276**, 407–16.
- Goudet J (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices.
- Grant V (1949) Pollination systems as isolating mechanisms in angiosperms. *Evolution*, **3**, 82–97.
- Grant V (1981) *Plant speciation, 2nd edition*. Columbia University Press, New York.
- Green DM (2005) Designatable units for status assessment of endangered species. *Conservation Biology*, **19**, 1813–1820.
- Guo SW, Thompson EA (1992) Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, **48**, 361–372.
- Gustafsson S, Sjögren-Gulve P (2002) Genetic diversity in the rare orchid, *Gymnadenia odoratissima* and a comparison with the more common congener, *G. conopsea*. *Conservation Genetics*, **3**, 225–234.
- Harder LD, Johnson SD (2009) Darwin's beautiful contrivances: evolutionary and functional evidence for floral adaptation. *New Phytologist*, **183**, 530–545.
- Hardy OJ, Charbonnel N, Freville H, Heuertz M (2003) Microsatellite allele sizes: a simple test to assess their significance on genetic differentiation. *Genetics*, **163**, 1467–1482.
- Harmon LJ, Melville J, Larson A, Losos JB (2008) The role of geography and ecological opportunity in the diversification of day geckos (*Phelsuma*). *Systematic Biology*, **57**, 562–73.

- Hedrick PW (2005) A standardized genetic differentiation measure. *Evolution*, **59**, 1633–8.
- Hendry AP (2009) Ecological speciation! Or the lack thereof? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **66**, 1383–1398.
- Hendry AP, Bolnick DI, Berner D, Peichel CL (2009) Along the speciation continuum in sticklebacks. *Journal of Fish Biology*, **75**, 2000–36.
- Herrera CM (1988) Variation in mutualisms: the spatiotemporal mosaic of a pollinator assemblage. *Biological Journal of the Linnean Society*, **35**, 95–125.
- Howarth DG, Baum DA (2005) Genealogical evidence of homoploid hybrid speciation in an adaptive radiation of *Scaevola* (Goodeniaceae) in the Hawaiian islands. *Evolution*, **59**, 948–961.
- Huber FK, Kaiser R, Sauter W, Schiestl FP (2005) Floral scent emission and pollinator attraction in two species of *Gymnadenia* (Orchidaceae). *Oecologia*, **142**, 564–75.
- Humeau L, Dafreville S, Da Silva D *et al.* (2010) Isolation of 16 polymorphic microsatellite loci from *Jumellea rossii* (Orchidaceae) endemic to the Mascarene archipelago and cross-priming to other *Jumellea* species. *Molecular Ecology Resources*, **10**, 1098–1105.
- Humeau L, Paillet T, Thompson J (1999) Variation in the breeding system of two sympatric *Dombeya* species on La Réunion island. *Plant Systematics and Evolution*, **218**, 77–87.
- Hutchison D, Templeton AR (1999) Correlation of pairwise genetic and geographic distance measures: inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. *Evolution*, **53**, 1898–1914.
- International Seed Testing Association (ISTA) (2006) *International Rules for Seed Testing*. International Seed Testing Association, Bassorsdorf.
- IUCN (2012) *IUCN Red List Categories and Criteria: Version 3.1. Second edition*. Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
- IUCN France, CBNM, MNHN, FCBN (2013) *La liste rouge des espèces menacées en France - Chapitre Flore vasculaire de La Réunion*. Paris, France.
- Jacquemyn H, Brys R, Vandepitte K *et al.* (2007a) A spatially explicit analysis of seedling recruitment in the terrestrial orchid *Orchis purpurea*. *New Phytologist*, **176**, 448–59.
- Jacquemyn H, Honnay O, Paillet T (2007b) Range size variation, nestedness and species turnover of orchid species along an altitudinal gradient on Réunion Island: Implications for conservation. *Biological Conservation*, **136**, 388–397.
- Jacquemyn H, Micheneau C, Roberts DL, Paillet T (2005) Elevational gradients of species diversity, breeding system and floral traits of orchid species on Reunion Island. *Journal of Biogeography*, **32**, 1751–1761.
- Jauze J-M (2009) Avant-propos. *Les Cahiers d’Outre-Mer*, **62**, 3–6.
- Jersáková J, Malinová T (2007) Spatial aspects of seed dispersal and seedling recruitment in orchids. *New Phytologist*, **176**, 237–41.
- Jiggins CD, Mallet J (2000) Bimodal hybrid zones and speciation. *Trends in Ecology & Evolution*, **15**, 250–255.

- Johnson SD (2006) Pollinator-driven speciation in plants. In: *The ecology and evolution of flowers* (eds Harder LD, Barrett SCH), pp. 295–310. Oxford University Press, Oxford.
- Johnson SD, Anderson B (2010) Coevolution between food-rewarding flowers and their pollinators. *Evolution: Education and Outreach*, **3**, 32–39.
- Johnson SD, Burgoyne PM, Harder LD, Dötterl S (2011) Mammal pollinators lured by the scent of a parasitic plant. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **278**, 2303–10.
- Johnson SD, Steiner K (1997) Long-tongued fly pollination and evolution of floral spur length in the *Disa draconis* complex (Orchidaceae). *Evolution*, **51**, 45–53.
- Jombart T (2008) adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, **24**, 1403–1405.
- Jombart T, Devillard S, Balloux F (2010) Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics*, **11**, 94.
- Kambysellis M, Ho K, Craddock E (1995) Pattern of ecological shifts in the diversification of Hawaiian *Drosophila* inferred from a molecular phylogeny. *Current biology*, **5**, 1129–39.
- Kay KM, Sargent RD (2009) The role of animal pollination in plant speciation: integrating ecology, geography, and genetics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **40**, 637–656.
- Kingsford RT, Watson JEM, Lundquist CJ *et al.* (2009) Major conservation policy issues for biodiversity in Oceania. *Conservation Biology*, **23**, 834–40.
- Kisel Y, Barraclough TG (2010) Speciation has a spatial scale that depends on levels of gene flow. *The American Naturalist*, **175**, 316–334.
- Knudsen J, Tollsten L (1993) Trends in floral scent chemistry in pollination syndromes: floral scent composition in moth pollinated taxa. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **113**, 263–284.
- Kreft H, Jetz W, Mutke J, Kier G, Barthlott W (2008) Global diversity of island floras from a macroecological perspective. *Ecology Letters*, **11**, 116–27.
- Lagabriele E, Rouget M, Payet K *et al.* (2009) Identifying and mapping biodiversity processes for conservation planning in islands: A case study in Réunion Island (Western Indian Ocean). *Biological Conservation*, **142**, 1523–1535.
- Lavergne R (1990) *Le grand livre des tisaneurs et plantes médicinales indigènes de l'île de la Réunion*. Orphie, Chevagny sur Guye.
- Lee C-R, Mitchell-Olds T (2011) Quantifying effects of environmental and geographical factors on patterns of genetic differentiation. *Molecular Ecology*, **20**, 4631–42.
- Levin DA (1978) The origin of isolating mechanisms in flowering plants. In: *Evolutionary Biology* (eds Hecht MK, Steere WC, Wallace B), pp. 185–317. Springer US, Boston, MA.

- Levin DA (2000) *The origin, expansion, and demise of plant species*. Oxford University Press, New York.
- Levin DA (2004) The ecological transition in speciation. *New Phytologist*, **1**, 91–96.
- Losos JB (2010) Adaptive radiation, ecological opportunity, and evolutionary determinism. *The American Naturalist*, **175**, 623–39.
- Losos JB, de Queiroz K (1997) Evolutionary consequences of ecological release in Caribbean *Anolis* lizards. *Biological Journal of the Linnean Society*, **61**, 459–483.
- Lowry DB (2012) Ecotypes and the controversy over stages in the formation of new species. *Biological Journal of the Linnean Society*, **106**, 241–257.
- Lowry DB, Modliszewski JL, Wright KM, Wu CA, Willis JH (2008a) The strength and genetic basis of reproductive isolating barriers in flowering plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **363**, 3009–21.
- Lowry DB, Rockwood RC, Willis JH (2008b) Ecological reproductive isolation of coast and inland races of *Mimulus guttatus*. *Evolution*, **62**, 2196–214.
- Luyt R, Johnson SD (2001) Hawkmoth pollination of the African epiphytic orchid *Mystacidium venosum*, with special reference to flower and pollen longevity. *Plant Systematics and Evolution*, **228**, 49–62.
- MacArthur RH, Wilson EO (1967) *The theory of island biogeography*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Mace GM (2004) The role of taxonomy in species conservation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **359**, 711–9.
- Machon N, Bardin P, Mazer SJ *et al.* (2003) Relationship between genetic structure and seed and pollen dispersal in the endangered orchid *Spiranthes spiralis*. *New Phytologist*, **157**, 677–687.
- MacNair MR, Christie P (1983) Reproductive isolation as a pleiotropic effect of copper tolerance in *Mimulus guttatus*? *Heredity*, **50**, 295–302.
- Magurran AE (1998) Population differentiation without speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **353**, 275–286.
- Mallet J (2008a) Mayr’s view of Darwin: was Darwin wrong about speciation? *Biological Journal of the Linnean Society*, **95**, 3–16.
- Mallet J (2008b) Hybridization, ecological races and the nature of species: empirical evidence for the ease of speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **363**, 2971–86.
- Mallet J, Beltrán M, Neukirchen W, Linares M (2007) Natural hybridization in heliconiine butterflies: the species boundary as a continuum. *BMC Evolutionary Biology*, **7**, 28.
- Mallet B, Martos F, Blambert L, Pailler T, Humeau L (2014) Evidence for isolation-by-habitat among populations of an epiphytic orchid species on a small oceanic island (D Canestrelli, Ed.). *PLos One*, **9**, e87469.

- Mallet B, Pailler T, Blambert L *et al.* (2012) Différences morphologiques et identification de *Jumellea rossii* et *Jumellea fragrans* (Orchidaceae) à l'île de la Réunion : implications pour la conservation. *Revue d'Écologie (Terre et Vie)*, **67**, 73–83.
- Margules CR, Pressey RL (2000) Systematic conservation planning. *Nature*, **405**, 243–53.
- Martín JL (2009) Are the IUCN standard home-range thresholds for species a good indicator to prioritise conservation urgency in small islands? A case study in the Canary Islands (Spain). *Journal for Nature Conservation*, **17**, 87–98.
- Martin D, Johnson S (2007) Pollination of aerangoid orchids in Kenya, with special reference to nectar sugar concentration gradients in the floral spurs. *American Journal of Botany*, **94**, 650–659.
- Martiré D, Rochat J (2008) *Les papillons de la Réunion et leurs chenilles*. Biotope Editions, Paris.
- Martos F, Munoz F, Pailler T *et al.* (2012) The role of epiphytism in architecture and evolutionary constraint within mycorrhizal networks of tropical orchids. *Molecular Ecology*, **21**, 5098–109.
- Maynard Smith J (1966) Sympatric speciation. *The American Naturalist*, **100**, 637–650.
- Mayr E (1942) *Systematics and the origin of species from the viewpoint of a zoologist*. Columbia University Press, New-York.
- Merrill RM, Gompert Z, Dembeck LM *et al.* (2011) Mate preference across the speciation continuum in a clade of mimetic butterflies. *Evolution*, **65**, 1489–500.
- Micheneau C, Carlsward BS, Fay MF *et al.* (2008a) Phylogenetics and biogeography of Mascarene angraecoid orchids (Vandaeae, Orchidaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **46**, 908–922.
- Micheneau C, Fournel J, Gauvin-Bialecki A, Pailler T (2008b) Auto-pollination in a long-spurred endemic orchid (*Jumellea stenophylla*) on Reunion Island (Mascarene Archipelago, Indian Ocean). *Plant Systematics and Evolution*, **272**, 11–22.
- Micheneau C, Fournel J, Humeau L, Pailler T (2008c) Orchid–bird interactions: a case study from *Angraecum* (Vandaeae, Angraecinae) and *Zosterops* (white-eyes, Zosteropidae) on Reunion Island. *Botany*, **86**, 1143–1151.
- Micheneau C, Fournel J, Pailler T (2006) Bird Pollination in an Angraecoid Orchid on Reunion Island (Mascarene Archipelago , Indian Ocean). *Annals of Botany*, **97**, 965–974.
- Micheneau C, Fournel J, Warren BH *et al.* (2010) Orthoptera, a new order of pollinator. *Annals of Botany*, **105**, 355–364.
- Micheneau C, Johnson SD, Fay MF (2009) Orchid pollination: from Darwin to the present day. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **161**, 1–19.
- Milá B, Warren BH, Heeb P, Thébaud C (2010) The geographic scale of diversification on islands: genetic and morphological divergence at a very small spatial scale in the

- Mascarene grey white-eye (Aves: *Zosterops borbonicus*). *BMC Evolutionary Biology*, **10**, 158.
- Mittermeier R, Gil PR, Hoffman M *et al.* (2005) *Hotspots revisited: Earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions*. Cemex, Mexico.
- Morales M, Ackerman JD, Tremblay RL (2010) Morphological flexibility across an environmental gradient in the epiphytic orchid, *Tolumnia variegata*: complicating patterns of fitness. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **163**, 431–446.
- Moritz C (2002) Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. *Systematic Biology*, **51**, 238–54.
- El Mousadik A, Petit RJ (1996) High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. *Theoretical and Applied Genetics*, **92**, 832–839.
- Myers N, Mittermeier R, Mittermeier C, Da Fonseca GAB, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, **403**, 853–858.
- Nakazato T, Warren DL, Moyle LC (2010) Ecological and geographic modes of species divergence in wild tomatoes. *American Journal of Botany*, **97**, 680–93.
- Van der Niet T, Johnson SD (2009) Patterns of plant speciation in the Cape floristic region. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **51**, 85–93.
- Van der Niet T, Peakall R, Johnson SD (2014) Pollinator-driven ecological speciation in plants: new evidence and future perspectives. *Annals of Botany*, **113**, 199–211.
- Nilsson L (1983) Processes of isolation and introgressive interplay between *Platanthera bifolia* (L.) Rich and *P. chlorantha* (Custer) Reichb. (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, **87**, 325–350.
- Nilsson L (1988) The evolution of flowers with deep corolla tubes. *Nature*, **334**, 147–149.
- Nilsson L, Jonsson L, Ralison L, Randrianjohany E (1987) Angraecoid orchids and hawkmoths in central Madagascar: specialized pollination systems and generalist foragers. *Biotropica*, **19**, 310–318.
- Nilsson LA, Jonsson L, Rason L, Randrianjohany E (1985) Monophily and pollination mechanisms in *Angraecum arachnites* Schltr. (Orchidaceae) in a guild of long-tongued hawk-moths (Sphingidae) in Madagascar. *Biological Journal of the Linnean Society*, **26**, 1–19.
- Nilsson LA, Rabakonandrianina E (1988) Hawk-moth scale analysis and pollination specialization in the epilithic Malagasy endemic *Aerangis ellisii* (Reichenb. fil.) Schltr. (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, **97**, 49–61.
- Nilsson LA, Rabakonandrianina E, Pettersson B (1992) Exact tracking of pollen transfer and mating in plants. *Nature*, **360**, 666–668.
- Nosil P (2007) Divergent host plant adaptation and reproductive isolation between ecotypes of *Timema cristinae* walking sticks. *The American Naturalist*, **169**, 151–162.
- Nosil P (2008) Speciation with gene flow could be common. *Molecular Ecology*, **17**, 2103–6.

- Nosil P (2012) *Ecological Speciation*. Oxford University Press, Oxford.
- Nosil P, Harmon LJ, Seehausen O (2009) Ecological explanations for (incomplete) speciation. *Trends in Ecology & Evolution*, **24**, 145–56.
- Nosil P, Vines TH, Funk DJ (2005) Reproductive isolation caused by natural selection against immigrants from divergent habitats. *Evolution*, **59**, 705–19.
- Ogden R, Thorpe RS (2002) Molecular evidence for ecological speciation in tropical habitats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 13612–5.
- Ollerton J, Winfree R, Tarrant S (2011) How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos*, **120**, 321–326.
- Orsini L, Vanoverbeke J, Swillen I, Mergeay J, De Meester L (2013) Drivers of population genetic differentiation in the wild: isolation by dispersal limitation, isolation by adaptation and isolation by colonization. *Molecular Ecology*, **22**, 5983–99.
- Osborne OG, Batstone TE, Hiscock SJ, Filatov DA (2013) Rapid speciation with gene flow following the formation of Mt. Etna. *Genome Biology and Evolution*, **5**, 1704–15.
- Otero JT, Ackerman JD, Bayman P (2004) Differences in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. *Molecular Ecology*, **13**, 2393–404.
- Otero JT, Bayman P, Ackerman JD (2005) Variation in mycorrhizal performance in the epiphytic orchid *Tolumnia variegata* in vitro: the potential for natural selection. *Evolutionary Ecology*, **19**, 29–43.
- Papadopoulos AST, Baker WJ, Crayn D *et al.* (2011) Speciation with gene flow on Lord Howe Island. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**, 13188–93.
- Papadopoulos A, Kaye M, Devaux C *et al.* (2014) Evaluation of genetic isolation within an island flora reveals unusually widespread local adaptation and supports sympatric speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **369**, 20130342.
- Papadopoulos AST, Price Z, Devaux C *et al.* (2013) A comparative analysis of the mechanisms underlying speciation on Lord Howe Island. *Journal of Evolutionary Biology*, **26**, 733–45.
- Parent CE, Crespi BJ (2009) Ecological opportunity in adaptive radiation of Galápagos endemic land snails. *The American Naturalist*, **174**, 898–905.
- Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, **6**, 288–295.
- Peakall R, Smouse PE (2012) GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics*, **28**, 2537–2539.
- Peakall R, Whitehead MR (2014) Floral odour chemistry defines species boundaries and underpins strong reproductive isolation in sexually deceptive orchids. *Annals of Botany*, **113**, 341–55.

- Le Péchon T, Dubuisson J-Y, Haevermans T *et al.* (2010) Multiple colonizations from Madagascar and converged acquisition of dioecy in the Mascarene Dombeyoideae (Malvaceae) as inferred from chloroplast and nuclear DNA sequence analyses. *Annals of Botany*, **106**, 343–57.
- Pellegrino G, Musacchio A, Noce ME, Palermo a M, Widmer A (2005) Reproductive versus floral isolation among morphologically similar *Serapias* L. species (Orchidaceae). *The Journal of Heredity*, **96**, 15–23.
- Peter CI, Johnson SD (2014) A pollinator shift explains floral divergence in an orchid species complex in South Africa. *Annals of Botany*, **113**, 277–88.
- Du Petit-Thouars AA (1822) *Histoire Particulière des Plantes Orchidées Recueillies sur les Trois Iles Australes d’Afrique, de France, de Bourbon et de Madagascar* (L’Auteur, Arthus-Bertrand, Treuttel, Würtz, Eds.). Paris.
- Phillips RD, Dixon KW, Peakall R (2012) Low population genetic differentiation in the Orchidaceae: implications for the diversification of the family. *Molecular Ecology*, **21**, 5208–20.
- Van der Pilj L, Dodson C (1966) *Orchid flowers: their pollination and evolution*. University of Miami Press, Coral Gables, Florida.
- Pinho C, Hey J (2010) Divergence with gene flow: models and data. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **41**, 215–230.
- Plunkett GM, Lowry PP (2010) Paraphyly and polyphyly in *Polyscias* sensu lato: molecular evidence and the case for recircumscribing the “pinnate genera” of Araliaceae. *Plant Diversity and Evolution*, **128**, 23–54.
- Possingham HP, Aneliman SJ, Burgman MA *et al.* (2002) Limits to the use of threatened species lists. *Trends in Ecology & Evolution*, **17**, 503–507.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**, 945–959.
- R Development Core Team (2012) R: A language and environment for statistical computing.
- Raguso RA, Levin RA, Foose SE, Holmberg MW, Mcdade LA (2003) Fragrance chemistry, nocturnal rhythms and pollination “syndromes” in *Nicotiana*. *Phytochemistry*, **63**, 265–284.
- Raguso RA, Light DM (1998) Electroantennogram responses of male *Sphinx perelegans* hawkmoths to floral and “ green-leaf volatiles .” *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **86**, 287–293.
- Rakotoarivelo FP, Razafimandimbison SG, Mallet B, Faliniaina L, Pailler T (2012) Molecular systematics and evolutionary trends and relationships in the genus *Jumellea* (Orchidaceae): implications for its species limits. *Taxon*, **61**, 11.
- Ramírez SR, Gravendeel B, Singer RB, Marshall CR, Pierce NE (2007) Dating the origin of the Orchidaceae from a fossil orchid with its pollinator. *Nature*, **448**, 1042–5.

- Ramsey J, Bradshaw HD, Schemske DW (2003) Components of reproductive isolation between the monkeyflowers *Mimulus lewisii* and *M. cardinalis* (Phrymaceae). *Evolution*, **57**, 1520–34.
- Rasmussen HN (2002) Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant and Soil*, **244**, 149–163.
- Razafimandimbison SG, Taylor CM, Wikström N *et al.* (2014) Phylogeny and generic limits in the sister tribes Psychotrieae and Palicoureeae (Rubiaceae): Evolution of schizocarps in *Psychotria* and origins of bacterial leaf nodules of the Malagasy species. *American Journal of Botany*, **101**, 1102–1126.
- Reznick DN, Ricklefs RE (2009) Darwin’s bridge between microevolution and macroevolution. *Nature*, **457**, 837–42.
- Rieseberg LH, Willis JH (2007) Plant speciation. *Science*, **317**, 910–4.
- Rijsdijk KF, Hume JP, Bunnik F *et al.* (2009) Mid-Holocene vertebrate bone Concentration-Lagerstätte on oceanic island Mauritius provides a window into the ecosystem of the dodo (*Raphus cucullatus*). *Quaternary Science Reviews*, **28**, 14–24.
- Roberts DL (2001) Reproductive biology and conservation of the orchids of Mauritius. University of Aberdeen.
- Roberts DL, Brummitt N. (2006) The influence of geometric constraints on the colonisation, speciation and range expansion of orchids. In: *XVIIIth AETFAT Congress* , pp. 361–372.
- Rodrigues ASL, Pilgrim JD, Lamoreux JF, Hoffmann M, Brooks TM (2006) The value of the IUCN Red List for conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, **21**, 71–6.
- Rousset F (2008) GENEPOP’007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, **8**, 103–6.
- Rundle HD, Nosil P (2005) Ecological speciation. *Ecology Letters*, **8**, 336–352.
- Ryder OA (1986) Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. *Trends in Ecology & Evolution*, **1**, 9–10.
- Rymer PD, Manning JC, Goldblatt P, Powell MP, Savolainen V (2010) Evidence of recent and continuous speciation in a biodiversity hotspot: a population genetic approach in southern African gladioli (*Gladiolus*; Iridaceae). *Molecular Ecology*, **19**, 4765–82.
- Salmona J, Salamolard M, Fouillot D *et al.* (2012) Signature of a pre-human population decline in the critically endangered Reunion Island endemic forest bird *Coracina newtoni*. (J Aerts, Ed,). *Plos One*, **7**, e43524.
- Salvany T, Lahitte P, Nativel P, Gillot P-Y (2012) Geomorphic evolution of the Piton des Neiges volcano (Réunion Island, Indian Ocean): Competition between volcanic construction and erosion since 1.4Ma. *Geomorphology*, **136**, 132–147.
- Salzmann CC, Nardella AM, Cozzolino S, Schiestl FP (2007) Variability in floral scent in rewarding and deceptive orchids: the signature of pollinator-imposed selection? *Annals of Botany*, **100**, 757–65.

- Savolainen V, Anstett M-C, Lexer C *et al.* (2006) Sympatric speciation in palms on an oceanic island. *Nature*, **441**, 210–3.
- Sax DF, Gaines SD (2008) Species invasions and extinction: the future of native biodiversity on islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 11490–7.
- Schemske DW (2010) Adaptation and the origin of species. *The American Naturalist*, **176**, S4–S25.
- Schemske DW, Bradshaw HD (1999) Pollinator preference and the evolution of floral traits in monkeyflowers (*Mimulus*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 11910–5.
- Schiestl FP, Schlüter PM (2009) Floral isolation, specialized pollination, and pollinator behavior in orchids. *Annual Review of Entomology*, **54**, 425–446.
- Schlechter F (1915) Kritische Aufzählung der bisher von Madagaskar, den Maskarenen, Komoren und Seychellen bekanntgewordenen Orchidaceen. *Beihefte zum Botanischen Centrablatt*, **33**, 390–440.
- Schlötterer C (2000) Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, **109**, 365–371.
- Schluter D (2001) Ecology and the origin of species. *Trends in Ecology & Evolution*, **16**, 372–380.
- Schluter D (2009) Evidence for ecological speciation and its alternative. *Science*, **323**, 737–41.
- Schluter D, Grant P (1984) Determinants of morphological patterns in communities of Darwin’s finches. *The American Naturalist*, **123**, 175–196.
- Seehausen O, Terai Y, Magalhaes IS *et al.* (2008) Speciation through sensory drive in cichlid fish. *Nature*, **455**, 620–6.
- Senghas K (1967) *Jumellea rossii*, eine neue Orchidee von der Insel Réunion. *Die Orchidee*, **18**, 240–245.
- Servedio MR, Van Doorn GS, Kopp M, Frame AM, Nosil P (2011) Magic traits in speciation: “magic” but not rare? *Trends in Ecology & Evolution*, **26**, 389–97.
- Servedio MR, Noor MAF (2003) The role of reinforcement in speciation: theory and data. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **34**, 339–364.
- Shafer AB a, Wolf JBW (2013) Widespread evidence for incipient ecological speciation: a meta-analysis of isolation-by-ecology. *Ecology Letters*, **16**, 940–50.
- Shoushtari BD, Heydari R, Johnson GL, Arditti J (1994) Germination and viability staining of orchid seeds following prolonged storage. *Lindleyana*, **9**, 77–84.
- Shum Cheong Sing A, Smadja J, Brevard H *et al.* (1992) Volatile constituents of faham (*Jumellea fragrans* (Thou.) Schltr.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **40**, 642–646.

- Slatkin M (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, **139**, 457–462.
- Sletvold N, Ågren J (2010) Pollinator-mediated selection on floral display and spur length in the orchid *Gymnadenia conopsea*. *International Journal of Plant Sciences*, **171**, 999–1009.
- Smadja CM, Butlin RK (2011) A framework for comparing processes of speciation in the presence of gene flow. *Molecular Ecology*, **20**, 5123–40.
- Smith SE, Read DJ (1997) *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, San Diego.
- Sobel JM, Chen GF, Watt LR, Schemske DW (2010) The biology of speciation. *Evolution*, **64**, 295–315.
- Stebbins G (1950) *Variation and evolution in plants*. Columbia University Press, New York.
- Steen R, Aase ALTO (2011) Portable digital video surveillance system for monitoring flower-visiting bumblebees. *Journal of Pollination Ecology*, **5**, 90–94.
- Steinbauer MJ, Otto R, Naranjo-Cigala A, Beierkuhnlein C, Fernández-Palacios J-M (2012) Increase of island endemism with altitude - speciation processes on oceanic islands. *Ecography*, **35**, 23–32.
- Stelkens RB, Seehausen O (2009) Phenotypic divergence but not genetic distance predicts assortative mating among species of a cichlid fish radiation. *Journal of Evolutionary Biology*, **22**, 1679–94.
- Stewart J, Hermans J, Campbell B (2006) *Angraecoid orchids: species from the african region*. Timber Press, Portland.
- Strasberg D, Rouget M, Richardson DM *et al.* (2005) An assessment of habitat diversity and transformation on La Réunion Island (Mascarene Islands, Indian Ocean as a basis for identifying broad-scale conservation priorities. *Biodiversity and Conservation*, **14**, 3015–3032.
- Strijk JS, Noyes RD, Strasberg D *et al.* (2012) In and out of Madagascar: dispersal to peripheral islands, insular speciation and diversification of Indian Ocean daisy trees (*Psiadia*, Asteraceae). *Plos One*, **7**, e42932.
- Stuessy TF, Jakubowsky G, Gomez RS *et al.* (2006) Anagenetic evolution in island plants. *Journal of Biogeography*, **33**, 1259–1265.
- Stuessy TF, Ono M (1998) *Evolution and speciation of island plants*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Surget-Groba Y, Johansson H, Thorpe RS (2012) Synergy between allopatry and ecology in population differentiation and speciation. *International Journal of Ecology*, **2012**, 1–10.
- Swarts ND, Sinclair E a., Krauss SL, Dixon KW (2009) Genetic diversity in fragmented populations of the critically endangered spider orchid *Caladenia huegelii*: implications for conservation. *Conservation Genetics*, **10**, 1199–1208.

- Takebayashi N, Morrell PL (2001) Is self-fertilization an evolutionary dead end? Revisiting an old hypothesis with genetic theories and a macroevolutionary approach. *American Journal of Botany*, **88**, 1143–1150.
- Taylor DL, Bruns TD (1999) Population, habitat and genetic correlates of mycorrhizal specialization in the “cheating” orchids *Corallorhiza maculata* and *C. mertensiana*. *Molecular Ecology*, **8**, 1719–1732.
- Taylor D, Bruns T, Szaro T, Hodges SA (2003) Divergence in mycorrhizal specialization within *Hexalectris spicata* (Orchidaceae), a nonphotosynthetic desert orchid. *American Journal of Botany*, **90**, 1168–1179.
- Team RDC (2011) R: A language and environment for statistical computing.
- Templeton AR (2008) The reality and importance of founder speciation in evolution. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, **30**, 470–9.
- Thébaud C, Warren BH, Strasberg D, Cheke A (2009) Mascarene Islands, biology. In: *Encyclopedia of islands* (eds Gillespie R, Clague D), pp. 612–619. University of California Press, Berkeley.
- Thibert-Plante X, Hendry AP (2010) When can ecological speciation be detected with neutral loci? *Molecular Ecology*, **19**, 2301–14.
- Thorpe RS, Stenson AG (2002) Phylogeny, paraphyly and ecological adaptation of the colour and pattern in the *Anolis roquet* complex on Martinique. *Molecular Ecology*, **12**, 117–132.
- Thorpe RS, Surget-Groba Y, Johansson H (2010) Genetic tests for ecological and allopatric speciation in anoles on an island archipelago. *Plos Genetics*, **6**, e1000929.
- Tremblay RL, Ackerman JD, Zimmerman JK, Calvo RN (2005) Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. *Biological Journal of the Linnean Society*, **84**, 1–54.
- Turelli M, Barton NH, Coyne JA (2001) Theory and speciation. *Trends in Ecology & Evolution*, **16**, 330–343.
- UICN France, MNHN, FCBN, CBNM (2010) *La liste rouge des espèces menacées en France - Chapitre flore vasculaire de La Réunion*. Paris, France.
- Vaughan R, Wiehe P (1937) Studies on the vegetation of Mauritius: I. A preliminary survey of the plant communities. *The Journal of Ecology*, **25**, 289–343.
- Vitousek PM (1988) Diversity and biological invasions of oceanic islands. In: *Biodiversity* (eds Wilson EO, Peters FM), pp. 181–189. National Academy Press, Washington D.C.
- Vujanovic V, St-Arnaud M, Barabé D, Thibeault G (2000) Viability testing of orchid seed and the promotion of colouration and germination. *Annals of Botany*, **86**, 79–86.
- Wallace AR (1880) *Island life: the phenomena and causes of insular faunas and floras*. McMillan and Co., London.
- Walter HS (2004) The mismeasure of islands: implications for biogeographical theory and the conservation of nature. *Journal of Biogeography*, **31**, 177–197.

- Wang IJ (2013) Examining the full effects of landscape heterogeneity on spatial genetic variation: a multiple matrix regression approach for quantifying geographic and ecological isolation. *Evolution*, **67**, 3403–3411.
- Waples RS, Do C (2008) LDNE: a Program for Estimating Effective Population Size From Data on Linkage Disequilibrium. *Molecular Ecology Resources*, **8**, 753–6.
- Waples RS, Gaggiotti OE (2006) What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Molecular Ecology*, **15**, 1419–1439.
- Wasserthal LT (1997) The pollinators of the malagasy star orchids *Angraecum sesquipedale*, *A. sororium* and *A. compactum* and the evolution of extremely long spurs by pollinator shift. *Botanica Acta*, **110**, 343–359.
- Waterman RJ, Bidartondo MI (2008) Deception above, deception below: linking pollination and mycorrhizal biology of orchids. *Journal of Experimental Botany*, **59**, 1085–96.
- Waterman RJ, Bidartondo MI, Stofberg J *et al.* (2011) The effects of above- and belowground mutualisms on orchid speciation and coexistence. *The American Naturalist*, **177**, E54–68.
- Weinig C (2002) Phytochrome photoreceptors mediate plasticity to light quality in flowers of the Brassicaceae. *American Journal of Botany*, **89**, 230–5.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**, 1358–1370.
- Whitehead MR, Peakall R (2014) Pollinator specificity drives strong prepollination reproductive isolation in sympatric sexually deceptive orchids. *Evolution*, **68**, 1561–75.
- Whittaker R (1998) *Island biogeography: ecology, evolution and conservation*. Oxford University Press, Oxford.
- Whittaker RJ, Triantis KA, Ladle RJ (2008) A general dynamic theory of oceanic island biogeography. *Journal of Biogeography*, **35**, 977–994.
- Whittall JB, Hodges SA (2007) Pollinator shifts drive increasingly long nectar spurs in columbine flowers. *Nature*, **447**, 706–9.
- Widmer A, Lexer C, Cozzolino S (2009) Evolution of reproductive isolation in plants. *Heredity*, **102**, 31–8.
- Wright S (1931) Evolution in mendelian populations. *Genetics*, **16**, 97–159.
- Wright S (1943) Isolation by distance. *Genetics*, **28**, 114–38.
- Wright S (1946) Isolation by distance under diverse systems of mating. *Genetics*, **31**, 39–59.
- Wu C-I (2001) The genic view of the process of speciation. *Journal of Evolutionary Biology*, **14**, 851–865.
- Yoder JB, Clancey E, Des Roches S *et al.* (2010) Ecological opportunity and the origin of adaptive radiations. *Journal of Evolutionary Biology*, **23**, 1581–96.